



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<b>(51) 国際特許分類 5</b> <b>A61K 47/48, 31/725</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO 92/06714</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 1992年4月30日 (30.04.1992)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP91/01431 <b>(22) 国際出願日</b> 1991年10月18日 (18. 10. 91)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平2/280628 1990年10月18日 (18. 10. 90) JP 特願平3/159611 1991年6月3日 (03. 06. 91) JP  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 株式会社 資生堂 (SHISEIDO CO., LTD) [JP/JP] 〒104-10 東京都中央区銀座7丁目5番5号 Tokyo, (JP) <b>(72) 発明者; および</b> <b>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)</b> 秋間和雄 (AKIMA, Kazuo) [JP/JP] 〒235 神奈川県横浜市磯子区杉田坪呑3-1-204 Kanagawa, (JP) 岩田佑平 (IWATA, Yuhei) [JP/JP] 〒233 神奈川県横浜市港南区港南台5-1-15-302 Kanagawa, (JP) 松尾香世子 (MATSUO, Kayoko) [JP/JP] 〒192-03 東京都八王子市南大沢5-3-1-418 Tokyo, (JP) 涉 信敏 (WATARI, Nobutoshi) [JP/JP] 〒215 神奈川県川崎市麻生区白山5-1-2-1008 Kanagawa, (JP) <b>(74) 代理人</b> 弁理士 岩橋祐司 (IWAHASHI, Yuji) 〒221 神奈川県横浜市神奈川区富家町1-13 Kanagawa, (JP)		<b>(81) 指定国</b> AT (欧州特許), AU, BE (欧州特許), CA, CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), IT (欧州特許), JP, LU (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US.  <b>添付公開書類</b> 国際調査報告書

**(54) Title : COMBINATION OF HYALURONIC ACID WITH MEDICINAL INGREDIENT AND PRODUCTION THEREOF**

**(54) 発明の名称** ヒアルロン酸-薬効成分結合物質及びその製造方法

**(57) Abstract**

A combination comprising hyaluronic acid and medicinal ingredient bonded to each other through a covalent bond, preferably, an amino bond. The hyaluronic acid moiety is completely decomposed metabolically at the affected part and the medicinal ingredient is released gradually in a quantitative manner.

(57) 要約

ヒアルロン酸と薬効成分を共有結合（好ましくはアミド結合）させたことを特徴とするヒアルロン酸－薬効成分結合物質およびその製造方法。

作用部位でヒアルロン酸部分が完全に代謝分解され、薬効成分が徐々に定量的に放出される。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	ES	スペイン	ML	マリ
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	MN	モンゴル
BB	バルバドス	FR	フランス	MR	モーリタニア
BE	ベルギー	GA	ガボン	MW	マラウイ
BF	ブルキナ・ファソ	GI	ギニア	NL	オランダ
BG	ブルガリア	GB	イギリス	NO	ノルウェー
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	PL	ポーランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	RO	ルーマニア
CA	カナダ	IT	イタリア	SD	スーダン
CF	中央アフリカ共和国	JP	日本	SE	スウェーデン
CG	コンゴ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SN	セネガル
CH	スイス	KR	大韓民国	SU <sup>+</sup>	ソビエト連邦
CI	コート・ジボアール	LI	リヒテンシュタイン	TD	チャード
CM	カメルーン	LK	スリランカ	TG	トーゴ
CS	チェコスロバキア	LU	ルクセンブルグ	US	米国
DE	ドイツ	MC	モナコ		
DK	デンマーク	MG	マダガスカル		

<sup>+</sup> SUの指定はロシア連邦の指定としての効力を有する。しかし、その指定が旧ソヴィエト連邦のロシア連邦以外の他の国で効力を有するかは不明である。

- 1 -

## 明 細 書

ヒアルロン酸－薬効成分結合物質及びその製造方法

### 〔技術分野〕

本発明はヒアルロン酸－薬効成分結合物質及びその製造方法、特にヒアルロン酸の生体内特定部位への指向性を利用したヒアルロン酸－薬効成分結合物質及びその製造方法に関する。

### 〔背景技術〕

例えば抗癌剤等の薬効成分は、生体内において所望の薬理作用を奏すると共に、生体に対する副作用が極めて重要である。

薬効成分の副作用の低下には、該薬効成分自体の副作用が低いことが望ましいが、その薬効成分を作用部位にのみ指向させることを可能とすれば、他の組織への副作用は非常に少なくてすむ。

最近、このような考え方にに基づき、いわゆるドラッグデリバリーシステムの開発が進んでおり、抗癌剤等一般に副作用の強い薬剤の投与には欠かせない技術となりつつある。

ところが、生体内における一般的なドラッグデリバリーシステムにあっては、基本的には体循環血液に依存しあるいは影響を受け、全身への影響を防止するのは極めて困難であった。

このため、極めて効果的な薬効を有しながら、他の組織への副作用を考慮しなければならないため、薬剤的

- 2 -

確な投与が難しい状況にあった。

一方、従来の薬効成分では特定の患部組織、特に癌組織等に対する指向性が低く、十分な薬効を得るためには多量の薬効成分投与が要求されていた。

そこで、従来においてもデキストラン、アルブミン等の各種高分子物質と薬効成分を結合させ、その高分子物質の体内組織指向性及び薬効成分の徐放性を利用して副作用の低減あるいは薬効の向上を図っている例がある。

しかし、従来用いられる高分子物質の殆どは生体、特に人体由来ではなく、人体に適用した場合、その分解、代謝に際して人体に与える負担が大きいという課題があった。

また、デキストラン等を用いた場合にも、縮合反応時に高分子物質の構造に変化が生じてしまい、やはり人体内には存在しない物質となってしまうことが多かった。

#### [発明の開示]

本発明は前記従来技術の課題に鑑みなされたものであり、他組織への影響を低く抑えつつ、効率的な薬効の発揮を可能とする薬効成分結合物質を提供することにある。

前記目的を達成するために本発明者らが鋭意検討した結果、人体内に普遍的に存在するヒアルロン酸に薬効成分を結合させることにより、生体内において特定部位への指向性の高い薬効成分結合物質が得られることを見出し本発明を完成するにいたった。

すなわち本出願の請求項1記載のヒアルロン酸－薬効

成分結合物質は、ヒアルロン酸と薬効成分を共有結合させたことを特徴とする。

請求項 2 記載のヒアルロン酸－薬効成分結合物質は、ヒアルロン酸のグルクロン酸残基のカルボキシル基に薬効成分がアミド結合されていることを特徴とする。

請求項 3 記載の癌のリンパ節転移抑制剤は、ヒアルロン酸－薬効成分結合物質において、薬効成分が抗癌剤であることを特徴とする。

請求項 4 記載の非特異的癌ミサイル療法剤は、ヒアルロン酸－薬効成分結合物質において、薬効成分は抗癌剤であることを特徴とする。

請求項 5 記載の癌のリンパ節転移抑制剤は、ヒアルロン酸がアセチル化ヒアルロン酸であることを特徴とする。

請求項 6 記載の非特異的ミサイル療法剤は、ヒアルロン酸がアセチル化ヒアルロン酸であることを特徴とする。

請求項 7 記載のヒアルロン酸－薬効成分結合物質の製造方法は、ヒアルロン酸ナトリウム水溶液にピリジン及び塩酸を加え攪拌後、1－エチル－3－（3－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）及びN－ヒドロキシコハク酸イミドを加え反応させるヒアルロン酸活性化工程と、活性化ヒアルロン酸をリン酸緩衝液に溶解させ、薬効成分水溶液を加え反応させる結合工程と、を含むことを特徴とする。

請求項 8 記載のアセチル化ヒアルロン酸－薬効成分結合物質の製造方法は、ヒアルロン酸としてアセチル化ヒ

アルロン酸を用い、有機溶媒系で水溶液中では行なえない合成法により薬効成分と反応させることを特徴とする。

請求項 9 記載のヒアルロン酸-薬効成分結合物質の製造方法は、ヒアルロン酸としてアセチル化ヒアルロン酸を用い、有機溶媒系で薬剤と結合反応させ、その後、アセチル基を除去することを特徴とする。

なお、本発明において薬効成分としては、マイトマイシン C、ダウノマイシン、クロモミシン A<sub>3</sub>、ブレオマイシン、ネオカルジノスタチン、アクチノマイシン D、アドリアマイシン、ミスラマイシン等の抗生物質系抗腫瘍剤、

ビス(2-クロロエチル)アミン(ナイトロジェンマスタード)誘導体、アジリジン(エチレンイミン)誘導体、メタンスルホン酸エステル誘導体、N-アルキル-N-ニトロソ尿素誘導体、臭化アルキル誘導体、塩酸メクロレタミン、クロランブチル、メルファラン、シクロフォスファミド、トリエチレンメラミン、チオテパ、ブスルファン等のアルキル化剤系抗腫瘍剤、

メルカプトプリン、フルオロウラシル、N<sub>1</sub>-(2-テトラヒドロフリル)-5-フルオロウラシル、塩酸アンシタビン等の代謝拮抗物質系抗腫瘍剤、

ジエチルスチルベストロール、ヘキセストール、エチニルエストラディオール、テストステロンプロピオネート、フルオキシメステロン、ドロモスタノロンプロピネ

ート、プレドニゾン、プレドニゾロン等のホルモン物質系抗腫瘍剤、  
の外、L-アスパラギナーゼ、ビンカアルカロイド等が挙げられる。

ヒアルロン酸の体内動態、さらにはヒアルロン酸-薬効成分結合物質の体内動態については、未だそのすべてが解明されたわけではない。

そこで、本発明者らは分子量1,000kdのヒアルロン酸ナトリウムの<sup>14</sup>C標識体を用い、ヒアルロン酸の体内動態を探った。

すなわち、<sup>14</sup>C標識ヒアルロン酸を、所属リンパ節が明かとなっているSD系雄性ラット（体重350～500g）の膝関節腔ならびに大腿部皮下に投与した。

そして、採取組織は、関節腔投与の場合には所属リンパ節である腰椎リンパ節、非所属リンパ節である腸管膜リンパ節、静脈内投与の場合の主代謝組織である肝臓および脾臓、全血ならびに血漿とした。

また、大腿皮下投与の場合には、もう一つの所属リンパ節である鼠径部リンパ節を加えた。

また、組織採取時間は、関節腔内投与の場合には投与後3, 6, 24および96時間後、大腿皮下投与の場合には投与後6時間とした。また、関節腔内投与の場合には、投与後6および24時間で腰椎リンパ節および肝臓のヒアルロン酸濃度も測定した。

第1図～第4図は関節腔内投与後それぞれ3, 6, 2

4, および 96 時間後の各組織におけるヒアルロン酸分布を示し、第 5 図には大腿皮下投与後 6 時間後の各組織におけるヒアルロン酸分布を示す。

各図より明らかなように、投与後のいずれの時間においても、所属リンパ節に際立って高い指向性が示された。特に投与後 3 時間の関節腔内投与においては、所属リンパ節の放射能濃度は血漿の 200 倍以上、肝臓の 50 倍以上であり、所属リンパ節指向性は特異的であった。また、投与後 96 時間の所属リンパ節濃度も高い値を維持し、持続性も示唆された。

投与後 6 時間において、所属リンパ組織および肝臓中のヒアルロン酸濃度を測定したところ、リンパ節においては高い値を示したが、肝臓では検出されなかった。従って、所属リンパ節の放射能分布はヒアルロン酸の分布を示すが、肝臓への放射能分布はヒアルロン酸の代謝分解物の分布を示していることが示唆される。

以上の結果、ヒアルロン酸は特異的に所属リンパ節に移行し、リンパ節で代謝分解されることが理解される。

また、ヒアルロン酸ナトリウムは体内に投与された場合、特に腫瘍組織に特異的に集積することも見出された。

そこで、本発明者等はこのような高分子量ヒアルロン酸の優れたキャリアーとしての性質に着目し、薬効成分との結合について鋭意検討したところ、ヒアルロン酸の本質的な物理化学的性質を保持したヒアルロン酸-薬効成分結合物質の合成に成功したのである。



本発明にかかる結合物質は、例えば癌患者の癌の近傍の皮下組織及び筋肉組織等に投与されると、癌と同一の所属リンパ節に特異的に移行し、かつ持続する。さらに、リンパ節でのヒアルロン酸の代謝分解によって抗癌剤が定量的に遊離される。そして、その優れたリンパ節指向性のため副作用を殆ど示さず、リンパ経由での癌の転移をほぼ完全に抑制する。

また、ヒアルロン酸が患部組織、特に腫瘍組織に特異的に集積することにより、ヒアルロン酸を薬効成分と結合させ投与することで、低い投与量においても作用部位に高濃度に薬効成分を集中させることができ、薬効を効率的に発揮させることができる。

[図面の簡単な説明]

第1図～第4図は膝関節腔内に $^{14}\text{C}$ 標識ヒアルロン酸を投与した場合の、所定時間経過後の各組織の $^{14}\text{C}$ の分布を示す説明図、

第5図は大腿皮下に $^{14}\text{C}$ 標識ヒアルロン酸を投与した場合の、6時間経過後の各組織の $^{14}\text{C}$ の分布を示す説明図、

第6図はヒアルロン酸－マイトマイシンC結合物質の製造方法の説明図、

第7図は本発明にかかるヒアルロン酸－薬効成分結合物質のゲルろ過パターンの説明図、

第8図はヒアルロン酸ナトリウムと、本発明にかかるヒアルロン酸－薬効成分結合物質の紫外吸収スペクト

ルの説明図、

第 9 図はヒアルロン酸ナトリウムと、本発明にかかるヒアルロン酸-薬効成分結合物質の可視部吸収スペクトルの説明図、

第 10 図はヒアルロン酸-マイトマイシン C 投与時のマウスの体重変化を、対照およびマイトマイシン C 単独投与と比較した説明図、

第 11 図は本発明にかかるヒアルロン酸-ダウノマイシン結合物質のゲルろ過パターンの説明図、

第 12 図はヒアルロン酸ナトリウムと、本発明にかかるヒアルロン酸-ダウノマイシン結合物質の可視部吸収スペクトルの説明図、

第 13 図はヒアルロン酸-ダウノマイシン結合物質の、中性及び 0.1 N-NaOH 溶液の可視部吸収スペクトルの説明図、

第 14 図はヒアルロン酸-ダウノマイシン結合物質の、中性及び 0.1 N-NaOH 溶液の紫外部吸収スペクトルの説明図、

第 15 図はヒアルロン酸-5FU 結合物質の製造方法の説明図、

第 16 図はヒアルロン酸-5FU 結合物質の紫外部吸収スペクトルの説明図、

第 17 図はヒアルロン酸-5FU 結合物質のゲル濾過パターンの説明図、

第 18 図はヒアルロン酸-エピルビシン結合物質の可

視部吸収スペクトルの説明図、

第 19 図はヒアルロン酸－エピルビシン結合物質のゲル濾過パターンの説明図、

第 20 図は実施例で用いたエピルビシンの検量線の説明図、

第 21 図はヒアルロン酸－エピルビシン結合物質をラット大腿部皮下に投与し、24 時間経過した場合の各組織でのヒアルロン酸－エピルビシン結合物質の分布を示す説明図、

第 22 図はヒアルロン酸－サイトシンアラビノシド結合物質の紫外部吸収スペクトルの説明図、

第 23 図はヒアルロン酸－サイトシンアラビノシド結合物質のゲル濾過パターンの説明図である。

[発明を実施するための最良の形態]

以下、図面を参照しつつ本発明の好適な実施例について詳述する。

本発明にかかるヒアルロン酸薬効成分結合物質の一例として、ヒアルロン酸－抗癌剤結合物質を次のように製造することができる。

原料としては、医薬原料の高分子量ヒアルロン酸ナトリウム (Streptococcus Zooepidemicus の培養上清より精製、赤坂ら、粧技誌、22, 35-42, 1988) 並びに市販のマイトマイシン C (例えばシグマ社製) が使用できる。

高分子と低分子薬剤の結合法に一般的に用いられてい

るとしては、例えば臭化シアン法、過沃素酸酸化法、エピクロヒドリン法、混合酸無水物法、カルボジイミド法、活性エステル法、グルタルアルデヒド法及びSPDP法（N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate）等がある。

このうち、ヒアルロン酸のグルクロン酸残基のカルボキシル基に薬効成分をアミド結合させることが好適であり、特に水溶性カルボジイミド化試薬（1-Ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)carbodiimide（EDC）または1-Cyclohexyl-3-(2-morphorinyl-(4)-ethyl)-carbodiimide methyl-p-toluenesulphonate等）を用いることにより、ヒアルロン酸の基本構造に影響を与えることなく薬効成分とグルクロン酸残基のアミド結合を得ることができる。

次により具体的な実施例を示す。

#### 実施例 1 ヒアルロン酸—マイトマイシンC結合物質

##### 製造例 1

前述したように、ヒアルロン酸自体は生体内成分であり、抗原性などの心配が全くないものである。しかも生体内の作用部位で徐々に分解されるため、その分解に伴い薬効成分を徐々にしかも定量的に放出させることが期待される。

しかしながら、従来の一般的な高分子物質と薬効成分の結合方法では、反応の際にヒアルロン酸の基本構造が変化してしまい、期待される非抗原性、薬効成分徐放性を得ることが困難となってしまう。

そこで、本発明者らはヒアルロン酸の基本構造を変化させないような、該ヒアルロン酸のグルクロン酸残基を利用した薬効成分とのアミド結合を検討した。

ところで、ヒアルロン酸は有機溶剤に難溶で水溶液としなければ反応を進行させることができない。一方アミド化反応は脱水反応であるため、一般に非水系で反応を進行させている。

そこで本発明者らは脱水反応であるアミド化反応を次のような方法（第6図参照）により水系で進行させ、ヒアルロン酸の基本構造を変化させず、しかも比較的多量の薬効成分をヒアルロン酸にアミド結合させることを可能とした。

なお、このヒアルロン酸－薬効成分アミド化結合物は、生体内外において、ヒアルロン酸単独の場合と同様の反応を示す。

まず、1%ヒアルロン酸ナトリウム水溶液10 mlに400  $\mu$  lのピリジン及び2 mlの2 N塩酸を加え良く攪拌後、1 M－EDC 1 ml及び1 M－N－ヒドロキシサクシンイミド1 mlを加え均一になるように良く攪拌し、室温で5時間反応させる。

次に2 mlの1 M酢酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）を加えさらに30分間反応させることにより過剰のカルボジイミドを分解させる。

続いて、最終濃度60%（w/v）になるようにアセトンを攪拌しながら加えることにより、沈殿を得る。沈殿

は 3 0 0 0 rpm 3 0 分間遠心することにより集め、再度約 1 % になるように 2 % 酢酸ナトリウムに溶解、アセトンを加えて同様な方法により沈殿を集める。このアセトン沈殿操作を 3 回繰り返すことにより、N-ヒドロキシサクシンイミド化された活性化ヒアルロン酸を得る。

得られた活性化ヒアルロン酸は 1 0 ml の 0 . 1 M リン酸緩衝液 (pH 7 . 2) に溶解させ、マイトマイシン C の 1 % 水溶液 2 ml を加え室温で 2 日間反応させる。反応終了後 3 倍量のアセトンを加えて遠心することにより、反応物の沈殿を得る。このアセトン沈殿操作を 3 回繰り返すことにより、純粋なヒアルロン酸-マイトマイシン C 結合物を得る。最終沈殿は、室温で真空乾燥機で乾燥させることにより、濃赤紫色の粉末を得る。

以上のように本製造法によれば、脱水反応であるアミド化反応を水溶液中で行わせることができる。

なお、マイトマイシン C の 1 % 水溶液添加量は 0 . 1 ~ 5 ml で行なわれ、この場合には濃度に応じて淡赤紫色 ~ 濃赤紫色の粉末となる。

粉末は、等張化リン酸緩衝液に 0 . 5 % (w/v) に溶解させ、0 . 2 2  $\mu$  のメンブランフィルターでろ過することにより無菌の注射剤とすることができる。この溶液を同緩衝液で 1 0 倍に希釈して、セファクリル S - 1 0 0 0 のゲルろ過カラムに添加し、カルバゾール・硫酸法及び紫外吸収で検出したところ、ヒアルロン酸の溶出位置に一致してマイトマイシン C に由来する 3 1 0 nm の

紫外外部吸収が検出された（第7図参照）。

また、得られたヒアルロン酸-マイトマイシンC結合物質は以下の性質を有している。

①分子量10～10,000kd（各種分子量のヒアルロン酸で校正したセファクリルS-1000クロマトグラフィー、または極限粘度法により算出した）

②抗癌剤（マイトマイシンC）の結合量

重量％で0.1～30重量％（カルボキシル基活性化剤であるカルボジイミドの量、反応に用いる抗癌剤の量を変えることにより結合量を変化させることが可能である）

③性状：0.5％（w/v）水溶液にて淡赤紫色～濃赤紫色。無臭。

④溶解性：水、生理食塩液、等張化リン酸緩衝液に可溶。メタノール、アセトン、エーテル、クロロホルムに不溶。

⑤呈色反応：カルバゾール・硫酸反応、酸加水分解後エルソン・モルガン反応に陽性。

⑥紫外外部吸収：252nm, 310nmにピークを有し、また360nm付近に紫外外部吸収の肩を有する。

⑦抗癌剤の遊離：生体内でのヒアルロン酸の分解に伴ってマイトマイシンCが遊離される。また、強アルカリ処理することによりアミド結合が加水分解し、マイトマイシンCが遊離される。

⑧ゲルろ過パターン：セファクリルS-1000のゲルろ過カラムに添加後カルバゾール・硫酸反応を行なうと

分子量 500 kd のところに結合物質のピークが観察される。また、同じ位置にマイトマイシン C に起因する紫外部吸収が観察される（第 7 図参照）。

また、水に溶解させたときヒアルロン酸ナトリウム自身には 230 nm 以上の紫外部吸収はないが、本実施例にかかるヒアルロン酸-マイトマイシン C 結合物質では 252 nm, 310 nm にピークを、また 360 nm 付近に紫外部吸収の肩を認めた（第 8 図参照）。

また可視部では、528 nm を中心とするブロードな吸収が観察された（第 9 図参照）。

なお 0.1 N の酸性条件下では、遊離マイトマイシン C の場合においても、結合物質の場合においても 245 nm 付近に紫外部吸収を認めた。また、遊離マイトマイシン C の場合には、酸性条件下での芳香環アミノ基の安定化に基づく 308 nm の吸収も新たに認め、吸収波長は結合体のものとほぼ一致した。

また、本実施例では、マイトマイシン C の結合量（重量％）は、遊離マイトマイシン C 及び結合体の 245 nm における吸光度から算出して 11.5 % であり、遊離カルボキシル基の内の約 1/6 がマイトマイシン C に置換された。

なお、本発明のキャリアーとして使用されているヒアルロン酸ナトリウムは、もともと結合組織等に多量に存在する生体成分であり、またリンパ節で完全に分解された後は、主として炭素源として再利用されるので、従来



使用されている高分子キャリアーと比較して顕著に安全性が高い。

また、このヒアルロン酸－抗癌剤結合物質は、その優れたリンパ節指向性のためリンパ節以外の抗癌剤の濃度は、抗癌剤単独投与と比較して数十分の一以下であるので、超早期癌、癌の診断が確定していない患者にも転移予防の目的で安全に適用することができる。

さらにヒアルロン酸の癌組織指向性により体内でのマイトマイシンCの濃度を低く抑えつつ、患部組織で効率的に薬効を発揮させることができる。

#### 製造例 2

0.5%ヒアルロン酸ナトリウム水溶液120mlに2mlのピリジン及び10mlの2N-HClをこの順番に加え、PH4.75に調製する。続いて2gの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)ならびに1.5gのN-ヒドロキシコハク酸イミドを加え室温で5時間反応させてヒアルロン酸のカルボキシル基を活性化させた。過剰のEDCを1Mの酢酸ナトリウム溶液の添加により分解させた後、3回のアセトン沈殿により活性化ヒアルロン酸ナトリウムを精製した。活性化ヒアルロン酸ナトリウムは120mlの0.1Mリン酸緩衝液に溶解後300mgのマイトマイシンCを加え、室温で2日間反応させた。反応物は上記と同様に3回のアセトン沈殿により精製し、約600mgの純粋なヒアルロン酸－マイトマイシンC結合物質を得た。

このようにして得られたヒアルロン酸-マイトマイシン C 結合物質の極限粘度より求めた分子量は 227 k d であり、結合率は 3.5 % (w / w) であった。

#### 転移抑制試験①

次に本実施例にかかるヒアルロン酸-マイトマイシン C 結合物質の転移抑制効果試験について説明する。

製造例 2 で得られた結合物質を 4 % (w / v) の濃度となるように注射用生理食塩液に溶解させ、生理食塩液を対照として転移抑制効果をマイトマイシン C 単独投与の場合と比較検討した。

C 5 7 B L / 6 雌性マウス (6 週齢) の側腹部皮下に L e w i s l u n g c a r c i n o m a 細胞を  $1 \times 10^5$  個 / マウスに接種した。実験是一群 6 匹を用いた。薬物は注射用生理食塩溶液に溶解し、投与はマイトマイシン C に換算して 0.5, 1.0, 5.0 mg/kg の 3 水準を腫瘍移植部の反対側の側腹部皮下に行った。

単回投与は癌細胞接種後 1 日目、連続投与は接種後 1 日目、3 日目、5 日目に行った。担癌マウスは腫瘍移植後 22 日目に屠殺し、肺転移癌細胞重量を測定した。抗腫瘍効果の評価は、次式で示される腫瘍阻止率により行い、結果を表 - 1 に示す。

腫瘍阻止率 =  $100 \times (\text{対照群の肺転移癌細胞重量} - \text{投与群の肺転移癌細胞重量}) / (\text{対照群の肺転移癌細胞重量})$

表 - 1

薬物	投与量 (mg/kg) × 回数	阻止率 (%)
対照群		0 . 0
結合物質	1 . 0 × 1	6 4 . 6
マイトマイシン C	5 . 0 × 1	5 7 . 4
	1 . 0 × 1	1 4 . 9
	5 . 0 × 1	8 3 . 4
結合物質	0 . 5 × 3	9 9 . 4
マイトマイシン C	1 . 0 × 3	6 3 . 5
	0 . 5 × 3	5 1 . 1
	1 . 0 × 3	3 0 . 5

以上の結果より明らかなように、本実施例にかかるヒアルロン酸-マイトマイシン C 結合物質は単回、連続投与において、マイトマイシン C 単独投与よりも優れた肺転移抑制効果を示し、特に連続 3 回投与においては著効を示した。

#### 転移抑制試験②

次に、ヒアルロン酸-マイトマイシン C 結合物質のリンパ節経由転移抑制効果について説明する。

前記製造例 2 で得られた結合物質を 4 % (W/V) の濃度に注射用生理食塩溶液に溶解させ、生理食塩液投与群を対照として、リンパ節転移抑制効果をマイトマイシン C 単独投与群の場合と比較した。

すなわち C 3 H / H e 雌性マウスの足蹠皮下に  $1 \times 10^6$  個の MH-134 腹水肝癌細胞を移植した。実験は一群 6 匹を用いて行い、投与量はマイトマイシン C に換

算して 0.1 および 1 mg/kg の 2 水準とした。投与は移植翌日より癌移植した同足側の大腿部皮下に 3 回／週の間隔で行い、移植後 21 日目に動物を屠殺し、癌移植した同足側の鼠径部リンパ節の短径 (mm) および長径 (mm) を測定し、腫瘍径をその積で示した。また、摘出した各リンパ節組織はホルマリン固定を行い、病理学的検査を実施した。

結果を表 - 2 に示す。

表 - 2

群	投与量	投与部位	投与間隔	腫瘍径
コントロール	—	大腿皮下	3 回／週	71.2 ± 35.9
HA-MMC	0.1 mg/kg	大腿皮下	3 回／週	22.9 ± 5.3
HA-MMC	1.0 mg/kg	大腿皮下	3 回／週	32.0 ± 14.6
M M C	0.1 mg/kg	大腿皮下	3 回／週	23.8 ± 8.4
M M C	1.0 mg/kg	大腿皮下	3 回／週	全例死亡

リンパ節は癌のリンパ節転移によっても、またヒアルロン酸の単独投与によっても肥大する。しかし、ヒアルロン酸-マイトマイシン C 結合物質の 0.1 mg/kg 投与群のリンパ節の大きさは、マイトマイシン C 単独投与群とほぼ同じであり、マイトマイシン C 単独投与群に比べ強い転移抑制効果が認められた。1 mg 投与群では抗癌剤の副作用減弱とともに、強い転移抑制作用が観察された。また、病理学的検査において、結合物質投与群は、単独投与群と比較して癌の広範な壊死が観察され、この面からも強い転移抑制作用が裏付けられた。

#### 腫瘍増殖抑制試験①

次にヒアルロン酸-マイトマイシン C 結合物質の M e t h A 腫瘍に対する腫瘍抑制効果について説明する。

製造例 2 で得られた結合物質を 4 % (W/V) の濃度となるように注射用生理食塩液に溶解させ、生理食塩液投与群を対照として腫瘍増殖抑制効果をマイトマイシン C 単独投与群の場合と比較した。

雌性マウスの背部皮下に  $1 \times 10^6$  個の M e t h A 腫瘍を移植した。実験是一群 5 匹を用いて行い、投与量はマイトマイシン C に換算して 0.1 および 1 mg/kg とした。投与は移植翌日より 3 回 / 週の間隔で腹腔内に行い、移植後 21 日目に動物を屠殺し、癌組織の短径および長径を測定した。なお、結果は短径 (mm) と長径 (mm) の平均 { (短径 + 長径) / 2 } で示した。また、投与 14 および 21 日目には体重も測定した。

結果を次の表 - 3 に示す。

表 - 3

群	投与量	投与部位	投与間隔	腫瘍径
コントロール	—	腹腔	3 回 / 週	21.2 ± 0.8
HA-MMC	0.1mg/kg	腹腔	3 回 / 週	17.4 ± 5.1
HA-MMC	1.0mg/kg	腹腔	3 回 / 週	19.9 ± 4.7
M M C	0.1mg/kg	腹腔	3 回 / 週	19.9 ± 6.6
M M C	1.0mg/kg	腹腔	3 回 / 週	25.7 ± 1.0

本腫瘍のマイトマイシン C に対する感受性は弱く、マイトマイシン C の 1 mg/kg の投与では投与群の腫瘍がコントロール群より大であった。しかし、感受性は低いながらも、ヒアルロン酸-マイトマイシン C 結合物質はマ

— 20 —

イトマイシン C 単独投与を上回る抗腫瘍効果を示した。

なお、第 10 図に試験期間中の体重変化を示す。

同図より、マイトマイシン C 単独の 0.1 mg/kg 投与量で、投与後 14 日にかけて体重抑制が観察されたが、ヒアルロン酸-マイトマイシン C 結合物質投与群は体重抑制が観察されず、副作用の低減が示された。

#### 腫瘍増殖抑制試験②

次にヒアルロン酸-マイトマイシン C 結合物質の MH-134 腫瘍に対する腫瘍抑制効果について説明する。

製造例 2 で得られた結合物質を 4% (W/V) の濃度となるように注射用生理食塩液に溶解させ、生理食塩液投与群を対照として腫瘍増殖抑制効果をマイトマイシン C 単独投与群の場合と比較した。

C3H/He 雌性マウスの背部皮下に  $1 \times 10^6$  個の MH-134 腹水肝癌細胞を移植した。実験是一群 6 匹を用いて行い、投与量はマイトマイシン C に換算して 0.5 mg/kg とした。投与は移植翌日より 3 回/週の間隔で腹腔内に行い、移植後 21 日目に動物を屠殺し、癌組織の短径および長径を測定した。なお、結果は短径 (mm) と長径 (mm) の積 (短径  $\times$  長径) で示した。

また、摘出した各癌組織はホルマリン固定を行い、病理学的検査を実施した。

結果を表 - 4 に示す。

表 - 4

群	投与量	投与部位	投与間隔	腫瘍径
---	-----	------	------	-----

コントロール	—	腹腔	3回／週	461±227
HA-MMC	0.5mg/kg	腹腔	3回／週	81±84
MMC	0.5mg/kg	腹腔	3回／週	196±100

この結果、マイトマイシンCのみを投与した場合よりも、ヒアルロン酸に結合させた場合の方がはるかに腫瘍増殖を抑制していることが示唆され、癌ターゲティング療法に好適であることが理解される。

## 実施例2 ヒアルロン酸-ダウノマイシン結合物質

### 製造例1

前述したように、ヒアルロン酸は水溶性で、有機溶媒には難溶である。一方、ダウノマイシン等の多くの薬効成分は有機溶媒に易溶で、水には難溶である。

そこで、このような水難溶性の薬効成分をヒアルロン酸に効率的にアミド結合させるため、本発明者らは次のような製造方法を採用した。

1%ヒアルロン酸ナトリウム水溶液25mlに1mlのピリジン、5mlの2N塩酸及び15mlのジメチルホルムアミドを加えよく攪拌後、0.6gのN-ヒドロキシコハク酸イミド及び1gのEDCを加え室温で2時間反応させることによりヒアルロン酸のカルボキシル基を活性化させる。

続いて5Mのリン酸2カリウムを滴下し、pHを7.4にすると同時に過剰のEDCを分解する。20mgのε-アミノカプロン酸を加えて2時間室温で反応させ、メ

チレン基 5 個を介してカルボキシル基をヒアルロン酸に導入する。5 N-NaOHを加えてpHを12とすることにより不安定な結合を除去する。そして、酢酸を滴下し中和する。

100 mlのエタノールを徐々に攪拌しながら加えヒアルロン酸を沈殿させる（エタノール沈殿）。この操作を2度繰り返し低分子物質をすべて除去する。

スパーサーを導入したヒアルロン酸100 mgを9 mlの蒸留水に溶解する。1 mlのピリジン、5 mlの2 N塩酸及び4 mlのジメチルホルムアミドを加え混合して均一溶液とする。20 mgのダウノマイシンを加えた後、100 mgのEDCを攪拌しながら徐々に加え反応を開始する。5時間経過した後2 mlの1 M酢酸ナトリウム緩衝液を加え30分間攪拌することにより過剰のEDCを分解させる。

30 mlのアセトンを攪拌しながら徐々に滴下しヒアルロン酸を沈殿させる。沈殿は遠心操作により回収する。このアセトン沈殿操作を3回繰り返すことにより、純粋なヒアルロン酸-ダウノマイシン結合物を得る。最終沈殿は、室温で真空乾燥機で乾燥させることにより、橙色の粉末を得る。

粉末を等張化リン酸緩衝液に0.5% (W/V) となるように溶解させ、0.22  $\mu$ のメンブランフィルターで濾過することにより無菌の注射剤とすることができる。この溶液を同緩衝液で5倍に希釈して、セファクリルS-200のゲル濾過カラムに添加し、カルバゾール・硫



酸法及び 475 nm の可視部の吸収で検出したところ、ヒアルロン酸の溶出位置に一致してダウノマイシンに起因する 475 nm の可視部吸収が検出された(第 11 図参照)。

また、得られたヒアルロン酸-ダウノマイシン結合物質は以下の性質を有している。

① 分子量 10 ~ 10,000 kd (各種分子量のヒアルロン酸で校正したセファクリル S-1000 クロマトグラフィー、または極限粘度法により算出した)

② 抗癌剤 (ダウノマイシン) の結合量

重量%で 0.1 ~ 30 重量% (カルボキシル基活性化剤であるカルボジイミドの量、N-ヒドロキシコハク酸イミド、スペーサーの  $\epsilon$ -アミノカプロン酸、反応に用いる抗癌剤の量、反応時間等を変えることにより結合量を変化させることが可能である。)

③ 性状: 0.5% (W/V) 水溶液にて淡橙色 ~ 濃橙色。無臭。

④ 溶解性: 水、生理食塩液、等張化リン酸緩衝液に可溶。メタノール、エタノール、アセトン、エーテル、クロロホルムに不溶。

⑤ 呈色反応: カルバゾール・硫酸反応、ニンヒドリン反応、酸加水分解後エルソン・モルガン反応に陽性。

⑥ 吸収スペクトル: 470 ~ 500 nm にかけてなだらかな可視部の吸収を示し、遊離ダウノマイシンのスペクトルに一致する。またアルカリ性条件下においては、550 nm と 590 nm にシフトする。これは、ダウノマイシン

のフェノール性水酸基の存在によるものである。紫外部については255 nmに吸収のピークを示す（第12図、第13図、第14図参照）。

⑦ゲル濾過パターン：セファクリルS-200のゲル濾過カラムに添加後カルバゾール・硫酸法を行なうと試験管番号15番のところに結合物質のピークが観察される。また、475 nmで検出するとダウノマイシンに起因する可視部の吸収（橙色）が観察される（第11参照）。

#### 製造例 2

本発明者らはヒアルロン酸を有機溶媒可溶とするため、アセチル化ヒアルロン酸を用い、有機溶媒系で薬効成分との結合を行うことを検討した。

すなわち、アセチル化ヒアルロン酸500 mgを、よく脱水した100 mlのジメチルホルムアミド（0.5%，W/V）に攪拌溶解する。溶解後、-8～-10℃に冷却する。

攪拌しながら、1 mlのクロロ蟻酸イソブチル及びトリエチルアミンを加え、-8～-10℃で90分間反応させ、アセチル化ヒアルロン酸のカルボキシル基を活性化する。

300 mgのダウノマイシンを10 mlのジメチルホルムアミド並びに1 mlのトリエチルアミンの混液に溶解させ氷冷する。このものをアセチル化ヒアルロン酸溶液に加え、攪拌しながら0℃で一晩反応させる。

この後、あらかじめ氷冷した150 mlの精製水中に反

応液を投入し反応を停止する。そして、pH 12.5 になるように5N-NaOHを加え、室温で2時間攪拌してアセチル基を除去し、5M酢酸を加え中和する。

3倍量のアセトンを加え、合成されたヒアルロン酸-ダウノマイシン結合物を沈殿させる。沈殿は遠心操作により回収する。

沈殿を50mlの100mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)に溶解する。3倍量のアセトンを加え、ヒアルロン酸-ダウノマイシン結合物を沈殿させ、遠心操作により回収する。以上のアセトン沈殿操作を3回繰り返すことにより、純粋なヒアルロン酸-ダウノマイシン結合物を得る。最終沈殿は、室温で真空乾燥機により乾燥させることで、橙色粉末を得る。

粉末は製造例1と同様に処理することにより、無菌の注射剤とすることができる。

また、本実施例では、ダウノマイシンの結合量(重量%)は、遊離ダウノマイシン及び結合体の475nmにおける吸光度から算出して、29.6%であった。また、分子量は極限粘度法により求めたところ、51.7kdであった。

なお、本製造例では、非水溶液中での反応として、クロロ蟻酸イソブチルを使用しているが、縮合剤としてN,N-Bis[2-oxo-3-oxazolidinyl]phosphorodiamidic Chloride等を用いることもできる。

以上のように本製造例によれば、有機溶剤可溶性のア

セチル化ヒアルロン酸を用いて、非水溶液中で結合反応を行なわせるため、水溶液中では困難な合成反応を実施することで、初めて可能になった例である。

### 実施例 3    ヒアルロン酸－5 F U 結合物質

#### 製造例 1

第 15 図に示すような方法により、ヒアルロン酸－5 F U 結合物質を得た。

すなわち、アセチル化ヒアルロン酸 500 mg および 5－フルオロウラシル（5 F U）250 mg を 50 ml のピリジンに溶解する。

別に、0.9 ml のメチル p－トルエンスルホン酸に 0.55 ml の 2－クロロピリジンを加え、30 分間攪拌することによりピリジニウム塩を調製しておく。ピリジニウム塩溶液を攪拌させながら、先のヒアルロン酸、5－F U のピリジン溶液を徐々に滴下する。均一とした後、温度を 50℃ とし、36 時間反応させた。

反応終了後、反応液を氷冷し、5 倍量の n－ヘキサンを加え、合成されたアセチル化ヒアルロン酸－5 F U 結合物質を沈殿させる。沈殿は 0℃ で遠心することにより回収する。次に沈殿の半量を 25 ml のジメチルホルムアミドに溶解し、5 倍量の精製水を加えることにより目的の結合物質を沈殿させた。

以上の水沈殿操作を 3 回繰返すことにより、純粋なアセチル化ヒアルロン酸－5 F U 結合物質を得た。最終沈

殿は、室温で真空乾燥器により乾燥させることにより、148 mgの白色粉末を得た。なお、5FUの結合率は正確に算出するためアセチル基を除去して測定したところ、2.0%であった。沈殿の一部をエタノールに溶解して紫外吸収を測定したところ、5FUに起因する260 nmの紫外吸収が観察された（第14図）。更に、ゲル濾過法によりヒアルロン酸（530 nm）と5FU（260 nm）の溶出パターンを比較したところ、両者はほぼ一致し（第17図）、ヒアルロン酸-5FU結合物質が生成していることが示唆される。

また、分子量は製造例1のヒアルロン酸-5FU結合物質の分子量にアセチル残基の分子量を和して、約170 kdと算出された。

また、本実施例により得られるアセチル化ヒアルロン酸-5FU結合物質は脂溶性であり、少量のエタノール等の有機溶媒に溶解した後、生理食塩水を添加するとゲルとなる。このため、このゲルを癌部位の所属リンパ節に埋め込むと徐々にゲルが崩壊し、長時間にわたり持続的にリンパ節にアセチル化ヒアルロン酸-5FU結合物質が移行し、リンパ節転移の予防にも顕著に効果を有する。

また、ゲルであるため癌に直接埋め込むことも可能であり、癌部位の抗癌剤の濃度が他の投与方法と比較して著しく高く推移するため、癌の著しい退縮効果が期待される。更に動脈内投与することにより、癌部位の動脈

が栓塞し、容易な癌栓塞投与剤となり、高い抗腫瘍効果が期待できる。

このように、アセチル化ヒアルロン酸－5 F U 結合物質は、その物理化学的性質のため、大変有用性の高いものである。

### 製造例 2

前記製造例 1 のアセチル化ヒアルロン酸－5 F U 結合物質を 0.1 N の NaOH に懸濁させ、室温で 2 時間攪拌することによりヒアルロン酸の水酸基に結合したアセチル基を切断除去した。5 M 酢酸を加えて中和後、3 倍量のアセトンを加え合成されたヒアルロン酸－5 F U 結合物質を沈殿させる。沈殿は遠心操作により回収する。

沈殿を 25 ml の 100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) に溶解する。3 倍量のアセトンを加え、ヒアルロン酸－5 F U 結合物質を沈殿させ、遠心操作により回収する。以上のアセトン沈殿操作を 3 回繰返すことにより、純粋なヒアルロン酸－5 F U 結合物質を得る。最終沈殿は、室温で真空乾燥器により乾燥させることにより、白色粉末を得る。

粉末は、等張化リン酸緩衝液に 0.5 % (W/V) となるように溶解させ、0.22  $\mu$  のメンブランフィルターで濾過することにより無菌の注射剤とすることができる。

また、本実施例では 5 F U の結合量 (重量%) は、遊離 5 F U および結合体の 260 nm における吸光度から算出して 2.3 % であった。

また、分子量は極限粘度法により求めたところ、145 kdであった。

なお、本製造法ではアセチル化ヒアルロン酸を出発原料としているところに特徴を有し、有機溶媒中で反応が行えるため可能となった方法である。

#### 実施例 4 ヒアルロン酸－エピルビシン結合物質

##### 製造例

アセチル化ヒアルロン酸 1.5 g をよく脱水した 100 ml のジメチルホルムアミドに 1 % (W/V) の濃度となるように溶解する。約  $-10^{\circ}\text{C}$  に冷却後、液を攪拌させながら、750  $\mu\text{l}$  のクロロ蟻酸イソブチルおよびトリエチルアミンをこの順番にゆっくり滴下する。攪拌を更に 1 時間続け、アセチル化ヒアルロン酸のカルボキシル基を活性型に変換する。

250 mg のエピルビシンを 100 ml のジメチルホルムアミドに溶解する。溶解後 750  $\mu\text{l}$  のトリエチルアミンを加え、 $0^{\circ}\text{C}$  に冷却する。このものをアセチル化ヒアルロン酸溶液に徐々に滴下する。ゆっくり全体を攪拌させながら、 $4^{\circ}\text{C}$  で一晩反応させる。

反応終了後、予め氷冷した 200 ml の精製水を加え、反応を停止させる。pH 12～13 になるように 5 N - NaOH を攪拌しながら加え、 $4^{\circ}\text{C}$  で 2 時間反応し、 $\text{O}-$ アセチル基を除去する。5 M 酢酸を加え中和し、ヒアルロン酸－エピルビシン結合体の濃赤色沈殿が析出する

までアセトンを加える。0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液で沈殿を2回遠心洗浄し、未反応のエピルビシンを除去する。

最終沈殿は、真空乾燥器で減圧乾燥させることにより、ヒアルロン酸-エピルビシン結合体の純品を得ることができる。本品は濃赤色の粉末である。

本品は注射用生理食塩液に一部溶解しながらゲル状に懸濁し、皮下および腹腔内投与剤等の注射剤にすることができる。

本品は20～40%のエタノールまたはプロピレングリコールを含む注射用生理食塩液に溶解し、0.22  $\mu$ mのメンブランフィルターで濾過することにより無菌の注射剤にすることができる。

また、本実施例ではエピルビシンの結合量（重量%）は、遊離エピルビシンおよび結合体の495 nmにおける吸光度から算出して12.7%であった。また、分子量は分子量校正曲線を作製してゲル濾過での溶出位置から求めたところ、70 kdであった。

次に本実施例にかかるヒアルロン酸-エピルビシン結合物質の性状を示す。

- ① 分子量：10～10,000 kd
- ② 抗癌剤（エピルビシン）の結合量：0.1～45 重量%
- ③ 性状：0.5%（W/V）水溶液または水系溶液あるいは懸濁液にて淡～濃赤色透明、無臭。



④溶解性：結合率の比較的低い場合には水、生理食塩液、等張化リン酸緩衝液に可溶、結合率が高い場合には水、生理食塩液、等張化リン酸緩衝液に難溶。20～40%エタノールまたはプロピレングリコールを含む生理食塩液に可溶。いずれもエタノールおよびアセトンに難溶。エーテルおよびヘキサンに不溶。

⑤呈色反応：カルバゾール・硫酸反応、酸加水分解後エルソン・モルガン反応に陽性。

⑥可視部吸収：470～480nmにブロードなピークを、450および490nm附近に吸収の肩が観察される（第18図）。

⑦抗癌剤の遊離：生体内でのヒアルロン酸の代謝分解に伴ってエピルビシンが遊離される。

⑧セファクリルS-300を支持体とするゲル濾過カラムに添加後、カルバゾール・硫酸反応を行うと、分子量約70kdの位置に結合物質のピークが観察される。また、同じ位置にエピルビシンに起因する紫外部吸収が観察される（第19図）

#### 体内動態試験

次に、ヒアルロン酸－エピルビシン結合体の体内動態試験の結果について説明する。

使用したヒアルロン酸－エピルビシン結合体は、前記製造例で製造したものを1%（W/V）の濃度となるように生理食塩液に懸濁させて投与液とした。

動物は体重400～500gのSD系雄性ラット（一

群 5 匹) を使用し、ラット 1 匹当り  $100 \mu\text{l}$  (結合体として  $1 \text{ mg/匹}$ ) を大腿部皮下に投与した。投与後 24 時間でラットをエーテル麻酔下心臓採血して致死させ、直ちに肝臓、腸管膜リンパ節、腰椎リンパ節および鼠径部リンパ節を摘出し、組織湿重量を測定した。

摘出した各組織は、 $10 \text{ mM}$  リン酸緩衝液 -  $1.15\%$   $\text{KCl}$  ( $\text{pH } 7.8$ ) を加えてホモジネイトした。血漿はそのまま、各組織はホモジネイトに終濃度  $0.2\%$  となるようにプロテアーゼ (プロナーゼ) を加え、 $37^\circ\text{C}$  で一晩反応させてタンパク質を消化分解した。続いて終濃度  $0.2\%$  にセチルピリジニウムクロライドを加えてヒアルロン酸-エピルビシン結合体を沈殿させた。沈殿は  $0.5 \text{ M-NaCl}$  で抽出した。

ヒアルロン酸-エピルビシン結合体の濃度は、励起波長  $470 \text{ nm}$ 、蛍光波長  $585 \text{ nm}$  ( $\text{pH } 4.6$ ) で測定した。

第 20 図にエピルビシンの検量線を示すが、約  $10 \sim 300 \text{ ng/ml}$  の範囲で良好な直線性を示した。

第 19 図に血漿、肝臓、腸管膜リンパ節、腰椎リンパ節および鼠径部リンパ節のヒアルロン酸-エピルビシン結合体の濃度結果を示す。

所属リンパ節である腰椎および鼠径部リンパ節に極めて高い指向性が観察され、血漿中濃度のそれぞれ約 35 倍および 45 倍であった。ヒアルロン酸の代謝組織として知られる肝臓と比較しても 5 ~ 7 倍の高濃度であった。

炭素粒子（墨汁）はリンパ節に移行するが、リンパ節では代謝されないことからリンパ節に蓄積する。しかし、ヒアルロン酸－エピルビシン結合体（赤色を示す）はリンパ節に蓄積することなく、リンパ節で代謝されている現象が確認された。

以上説明したようにヒアルロン酸－エピルビシン結合体は、作用部位となる所属リンパ節である腰椎および鼠径部リンパ節に、血漿と比較して約50倍の高い指向性を有することが認められた。

#### 実施例 5    ヒアルロン酸－サイトシンアラビノシド結合物質

##### 製造例 1

アセチル化ヒアルロン酸 1 g を、脱水した 100 ml ジメチルホルムアミドに 1 % (W/V) の濃度に溶解する。約 -10℃ に冷却後、液を攪拌させながら、1 ml のクロロ蟻酸イソブチルおよびトリエチルアミンをこの順番にゆっくり滴下する。攪拌を更に 1 時間続け、アセチル化ヒアルロン酸のカルボキシ基を活性型に変換する。

300 mg のサイトシンアラビノシドをジメチルホルムアミド 10 ml に溶解する。溶解後 1 ml のトリエチルアミンを加え、0℃ に冷却する。このものをアセチル化ヒアルロン酸溶液に徐々に滴下する。ゆっくり全体を攪拌させながら、0℃ で一晩反応させる。

反応終了後、予め氷冷した 300 ml の精製水に投入し、

反応を停止させる。沈殿したアセチル化ヒアルロン酸ーサイトシンアラビノシドを遠心操作により分離する。沈殿は精製水で5回遠心操作し、未反応のサイトシンアラビノシドを除去する。

最終沈殿は真空乾燥器で減圧乾燥させることにより、アセチル化ヒアルロン酸ーサイトシンアラビノシドの純品を得ることができる。本品は、白色の繊維状を呈する。

本品を、30～50%のプロピレングリコールを含む注射用蒸留水に溶解させ、0.22  $\mu$ mのメンブランフィルターで濾過することにより無菌の注射剤とすることができる。

また本品は、10～20%のプロピレングリコールまたはエタノールを含む注射用生理食塩液に溶解させることができ、ゲル状を呈して懸濁し、有効な癌栓塞療法剤とすることができる。

#### 製造例 2

更に、アセチル化ヒアルロン酸ーサイトシンアラビノシド結合物質は、以下のようにアルカリ処理することにより、ヒアルロン酸ーサイトシンアラビノシド結合物質にすることができる。

アセチル化ヒアルロン酸ーサイトシンアラビノシド結合物質500mgを50mlの精製水に懸濁させる。攪拌しながら終濃度0.1Nになるように5N-NaOHを滴下する。室温で3時間攪拌を続けることによりO-アセチル基が除去され、沈殿は溶解する。そして、5M酢酸

を加え、中和する。

3 倍容量のアセトンを加え、生成したヒアルロン酸－サイトシンアラビノシド結合物質を沈殿させる。沈殿は遠心操作により回収する。

沈殿は 50 ml の 100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液に溶解させる。3 倍容量のアセトンを加え、ヒアルロン酸－サイトシンアラビノシド結合物質を沈殿させ、遠心操作により回収する。以上のアセトン沈殿操作を 3 回繰返すことにより、純粋なヒアルロン酸－サイトシンアラビノシド結合物質を得る。最終沈殿を、室温で真空乾燥器により乾燥させることにより、415 mg の白色粉末を得る。

粉末は製造例 1 と同様に処理することにより、無菌の注射剤とすることができる。

また、本実施例にでは、サイトシンアラビノシド結合量（重量％）は、遊離サイトシンアラビノシドおよび結合体の 272 nm における吸光度から算出して、16.43％であった。また、分子量は極限粘度法により求めたところ、86.8 kd であった。

以上のように製造したヒアルロン酸－サイトシンアラビノシド結合物質は、下記の性質を有する。

- ① 分子量：10～10,000 kd
- ② 抗癌剤（サイトシンアラビノシド）の結合量：0.1～45 重量％
- ③ 性状：0.5％（W/V）水溶液または水系溶液あるいは懸濁液にて無色透明・無臭。

④ 溶解性：水、生理食塩液、等張化リン酸緩衝液リン酸緩衝液に可溶、メタノール、アセトン、エーテル、クロホルムに不溶。

アセチル化ヒアルロン酸－サイトシンアラビノシドは、プロピレングリコールないしエタノールを30～50%含む水溶液に可溶。同じ溶媒を10～20%含む水溶液にゲル状に懸濁する。ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、エチレングリコール、プロピレングリコールに可溶。水、アセトン、エーテル、ヘキサンに不溶。

⑤ 呈色反応：カルバゾール・硫酸反応、酸加水分解後エルソン・モルガン反応に陽性。

⑥ 紫外吸収：247 nm、305 nmに紫外吸収のピークを有する（第22図）。

⑦ 抗癌剤の遊離：生体内でのヒアルロン酸の代謝分解に伴ってサイトシンアラビノシドが遊離される。

⑧ セファクリルS－200を支持体とするゲル濾過カラムに添加後、カルバゾール・硫酸反応を行うと分子量約90 kdの位置に結合物質のピークが観察される。また、同じ位置にサイトシンアラビノシドに起因する紫外吸収が観察される（第23図）。

以上説明したように本発明にかかるヒアルロン酸－薬効成分結合物質によれば、特定組織への強い指向性を有し、他の組織への副作用を効率的に抑制しつつ、薬効を十分に発揮させることができる。

### 請求の範囲

(1) ヒアルロン酸と薬効成分を共有結合させたことを特徴とするヒアルロン酸－薬効成分結合物質。

(2) 請求項1記載の物質において、ヒアルロン酸のグルクロン酸残基のカルボキシル基に薬効成分がアミド結合されていることを特徴とするヒアルロン酸－薬効成分結合物質。

(3) 請求項2記載の物質において、薬効成分は抗癌剤であることを特徴とする癌のリンパ節転移抑制剤。

(4) 請求項2記載の物質において、薬効成分は抗癌剤であることを特徴とする非特異的癌ミサイル療法剤。

(5) 請求項3記載の物質において、ヒアルロン酸はアセチル化ヒアルロン酸であることを特徴とする癌のリンパ節転移抑制剤。

(6) 請求項4記載の物質において、ヒアルロン酸はアセチル化ヒアルロン酸であることを特徴とする非特異的癌ミサイル療法剤。

(7) ヒアルロン酸ナトリウム水溶液にピリジン及び塩酸を加え攪拌後、1－エチル－3－(3－ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)及びN－ヒドロキシコハク酸イミドを加え反応させるヒアルロン酸活性化工程と、

活性化ヒアルロン酸をリン酸緩衝液に溶解させ、薬効成分水溶液を加え反応させる結合工程と、  
を含むことを特徴とするヒアルロン酸－薬効成分結合物

質の製造方法。

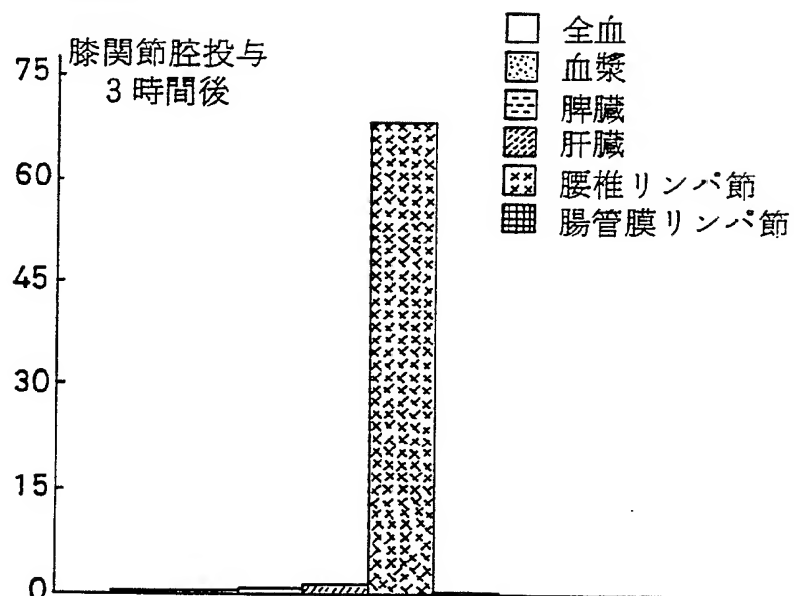
(8) 請求項7記載の製造方法において、ヒアルロン酸としてアセチル化ヒアルロン酸を用い、有機溶媒系で薬効成分と反応させることを特徴とするアセチル化ヒアルロン酸-薬効成分結合物質の製造方法。

(9) 請求項7記載の製造方法において、ヒアルロン酸としてアセチル化ヒアルロン酸を用い、有機溶媒系で薬剤と結合反応させ、その後、アセチル基を除去することを特徴とするヒアルロン酸-薬効成分結合物質の製造方法。



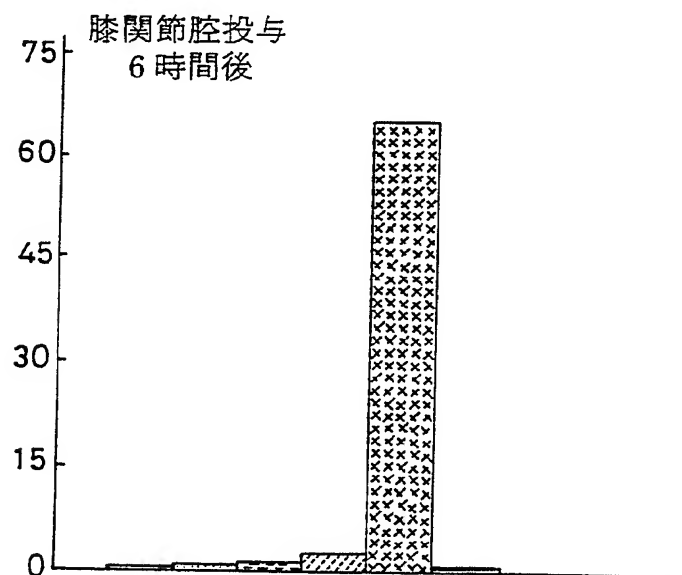
1 / 17

dpm/mg 組織



第 1 図

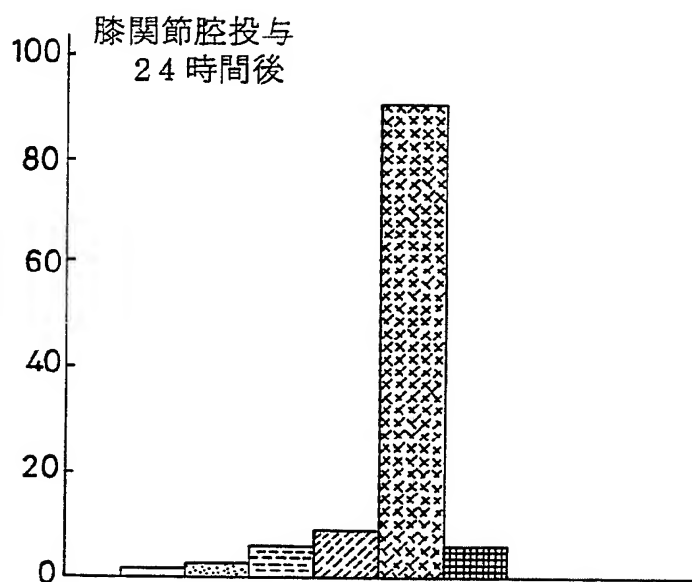
dpm/mg 組織



第 2 図

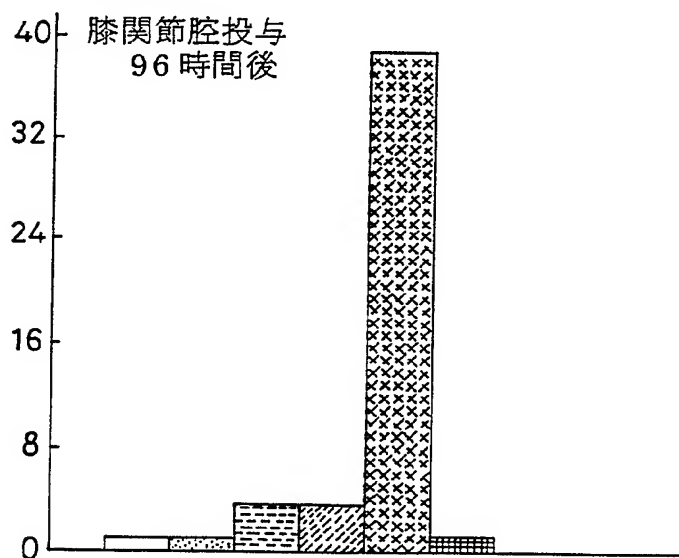
2 / 17

dpm / mg 組織



第 3 図

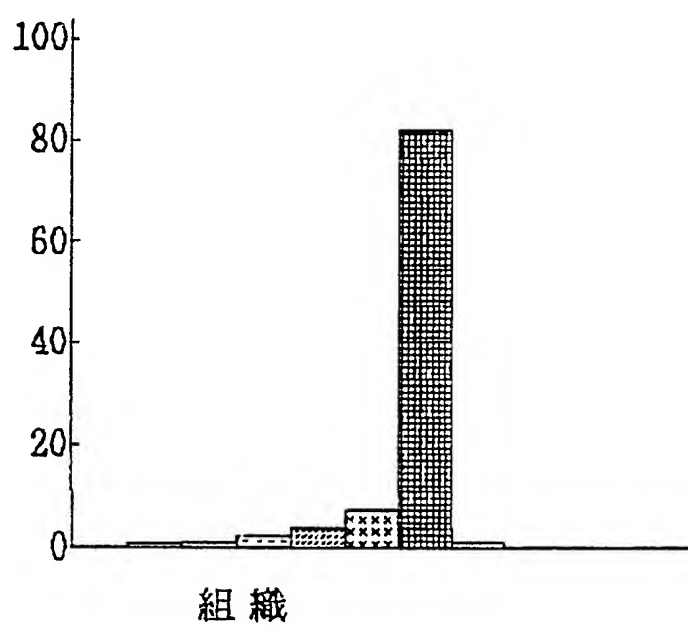
dpm / mg 組織



第 4 図

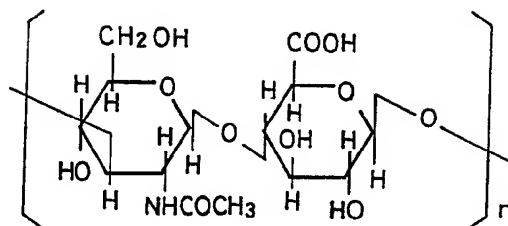
3/17

放射能  
dpm/mg組織

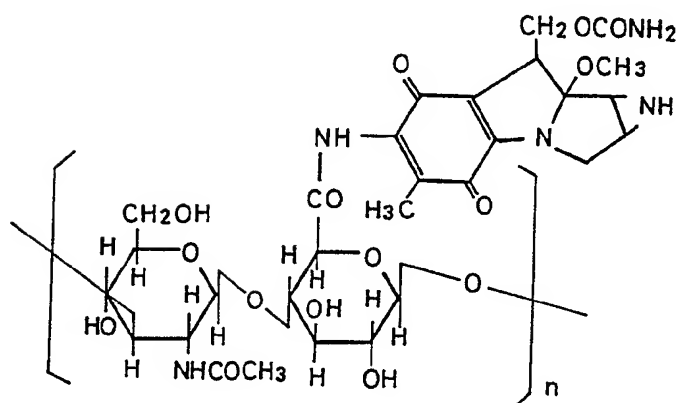
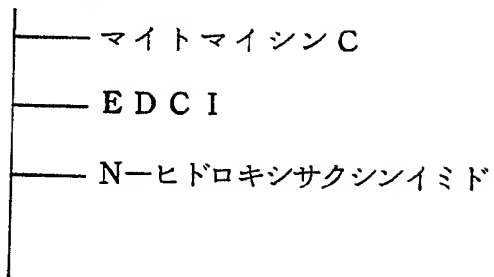


第5図

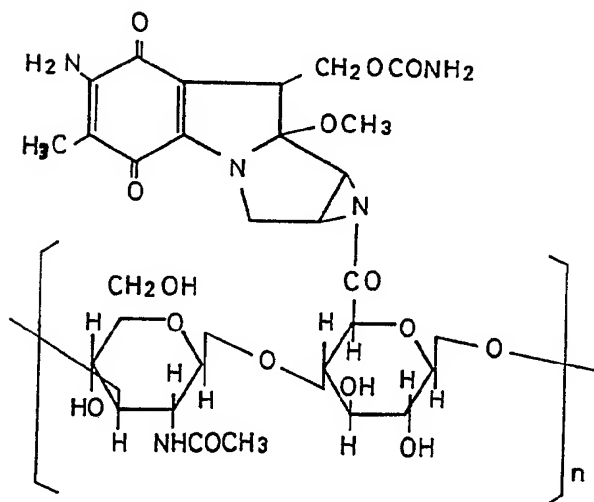
4 / 17



ヒアルロン酸

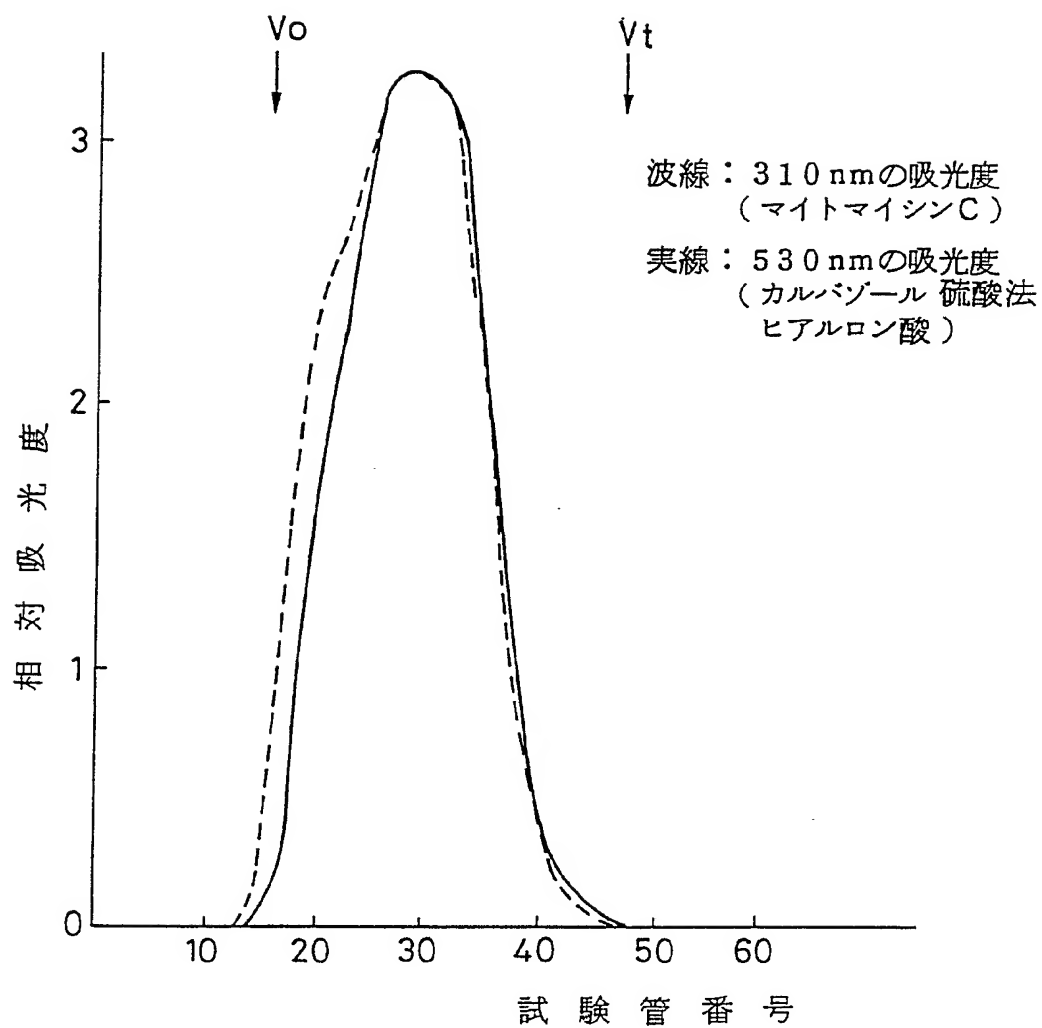


又は



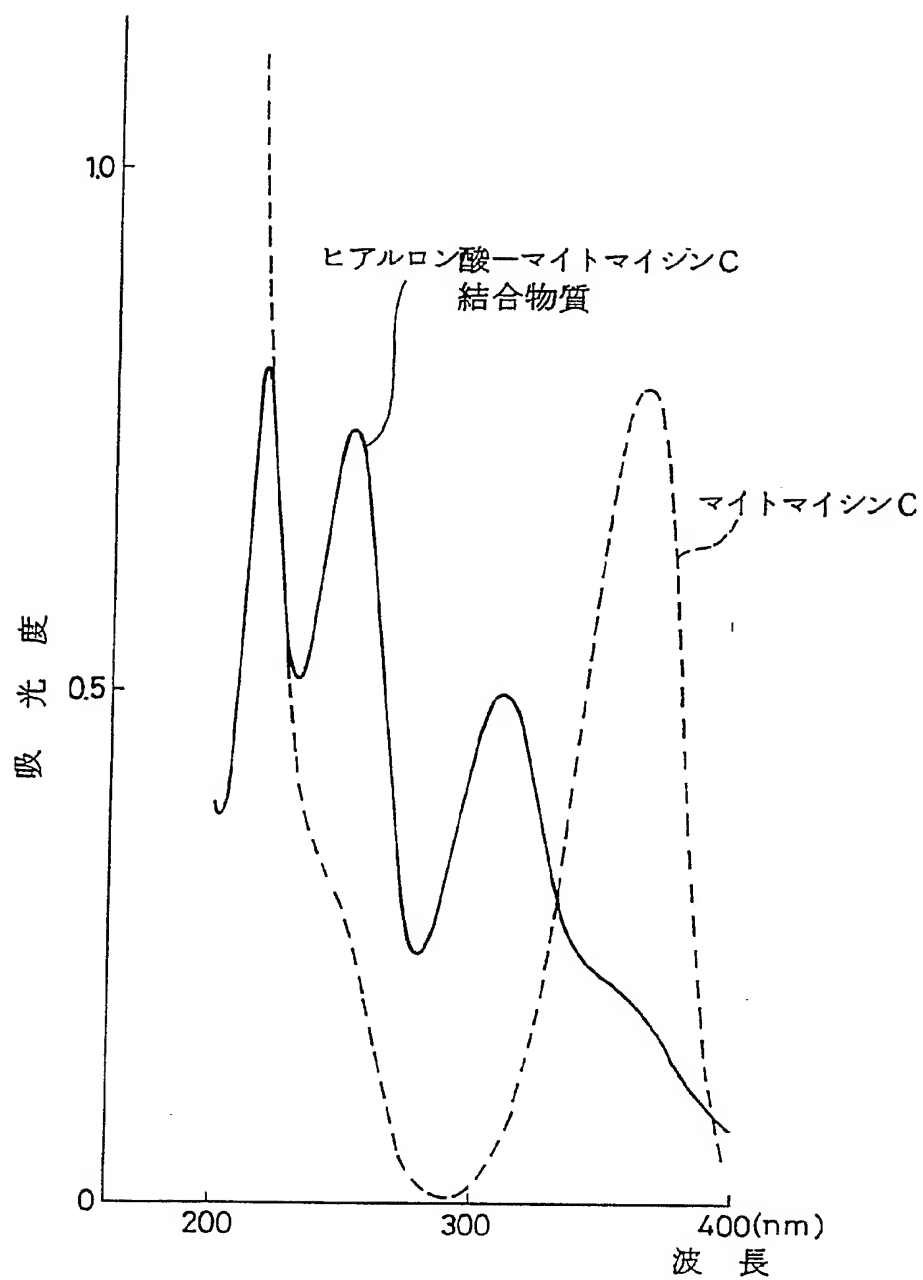
第 6 図

新たな用紙

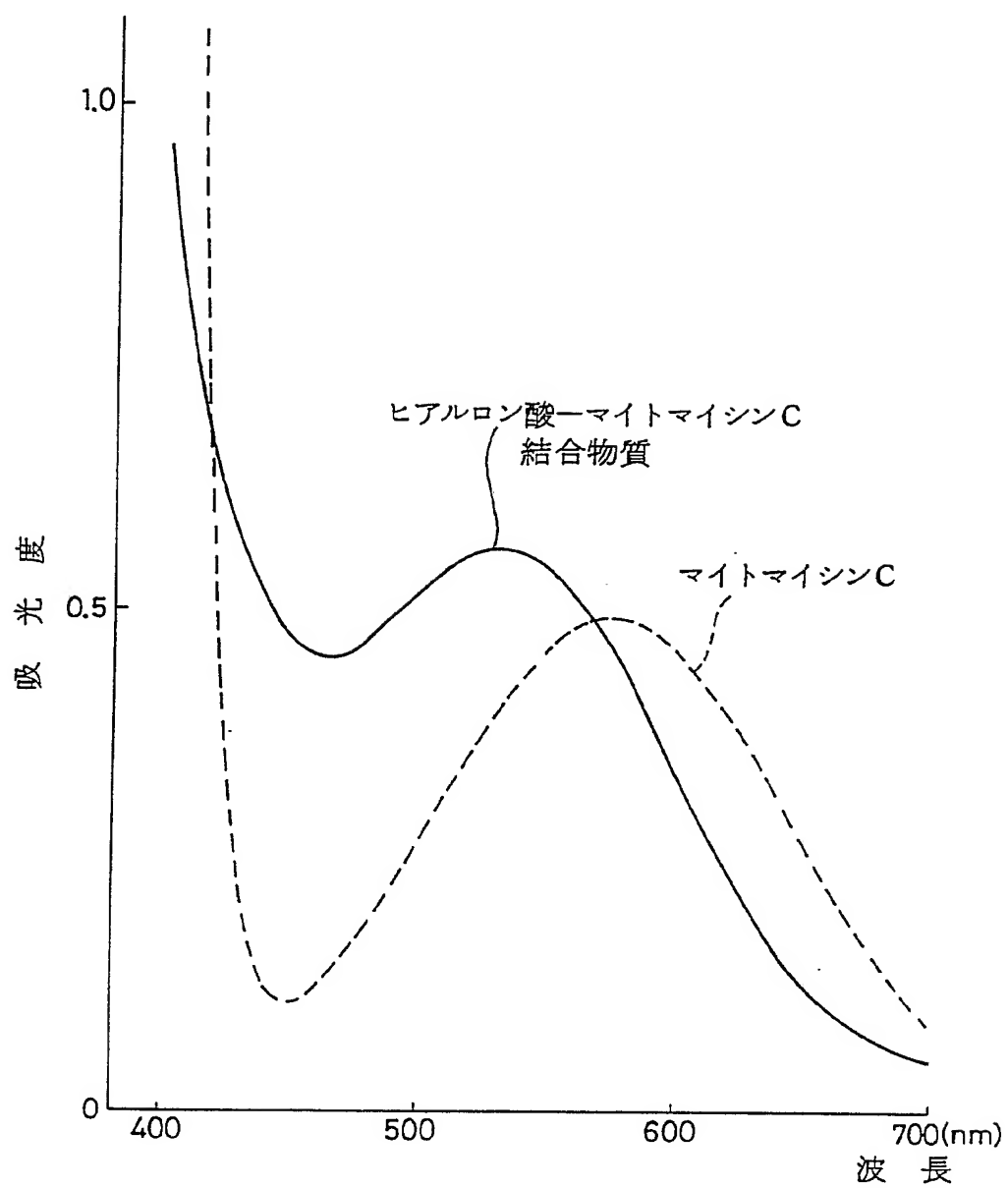


第7図

6/17



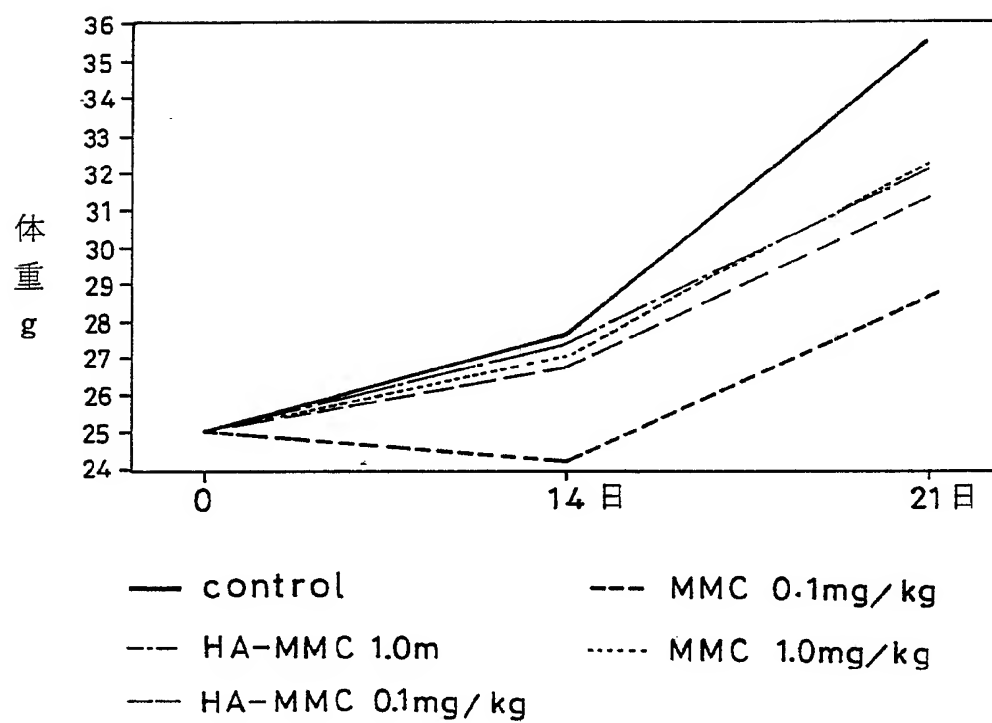
第8図



第9図

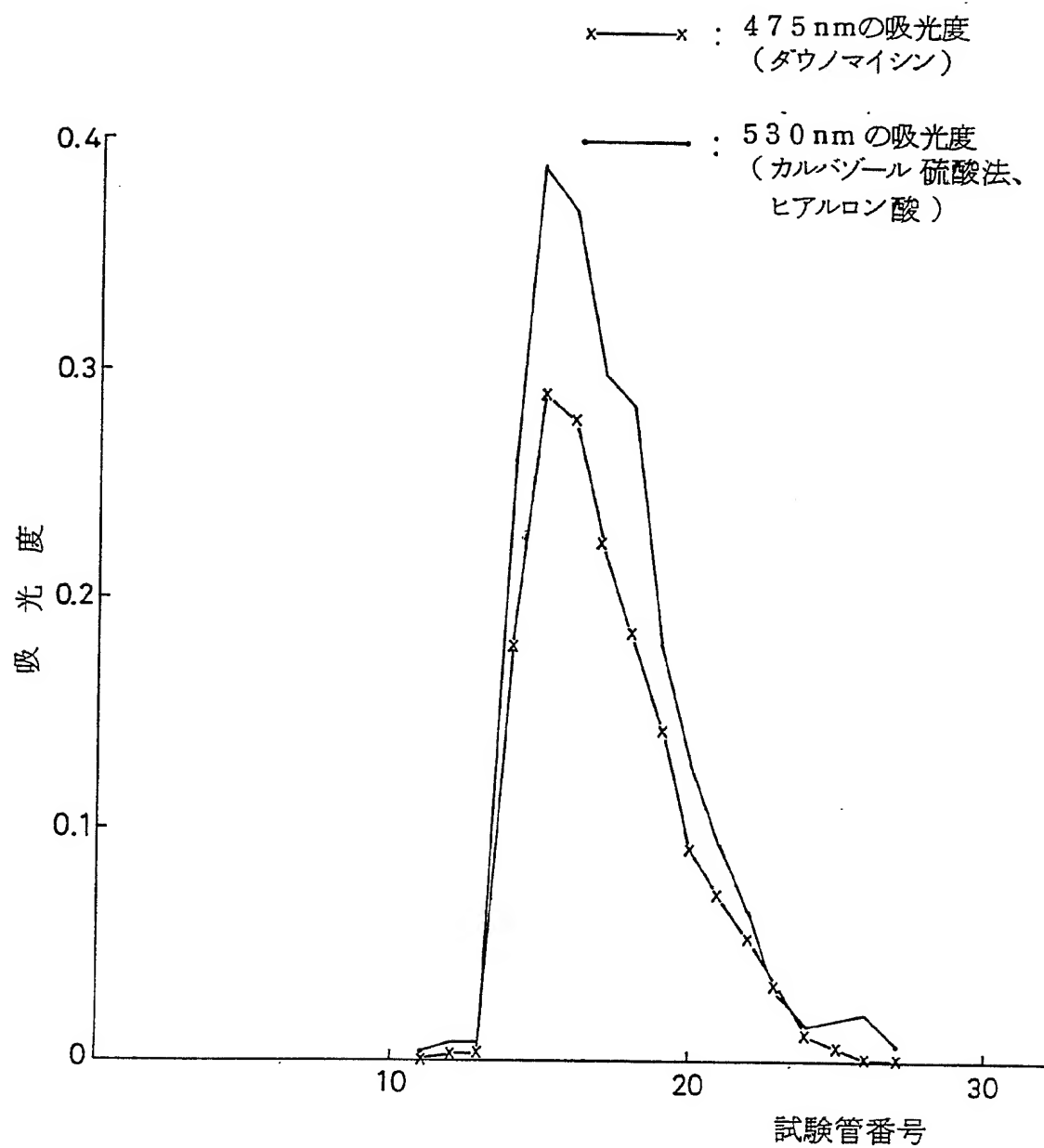
8 / 17

体重の変化

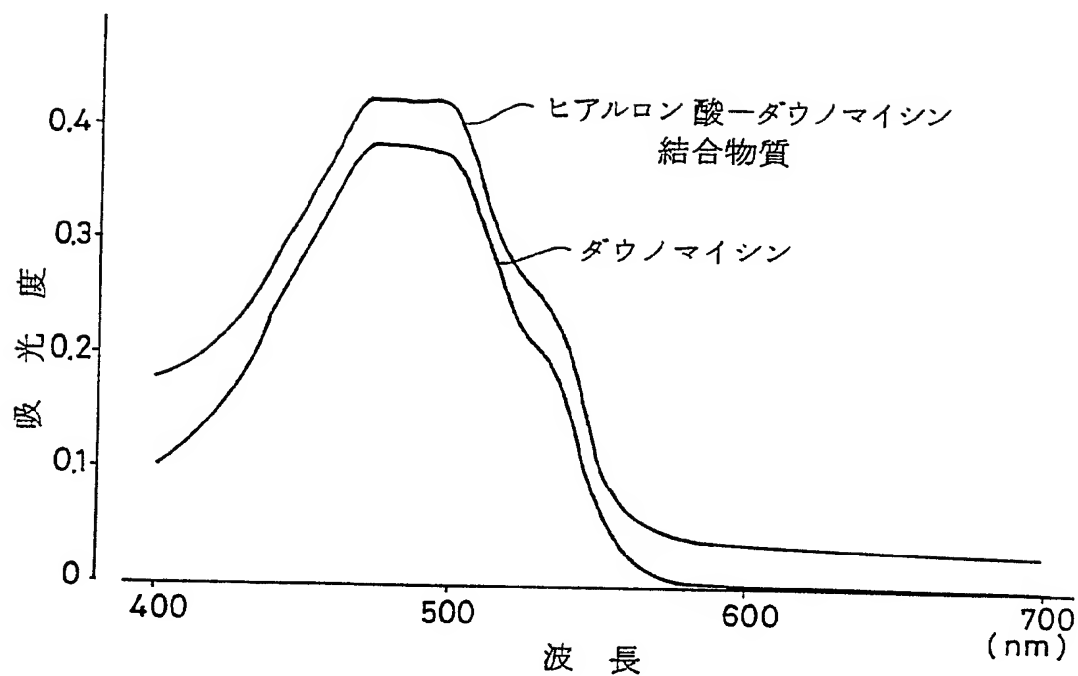


第10図

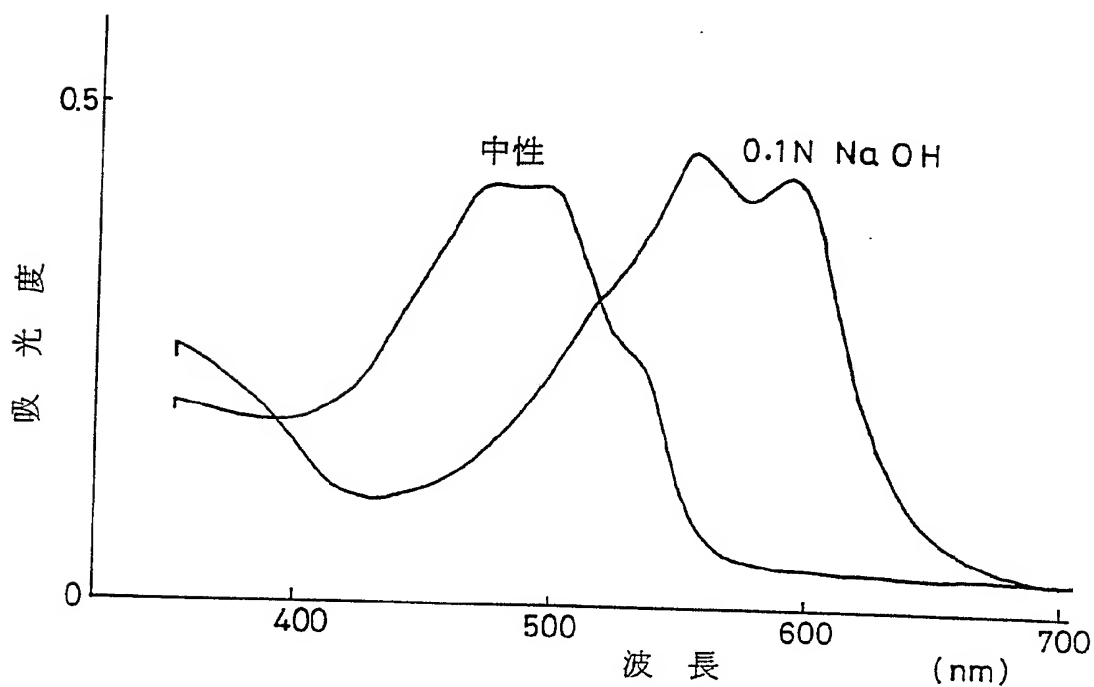




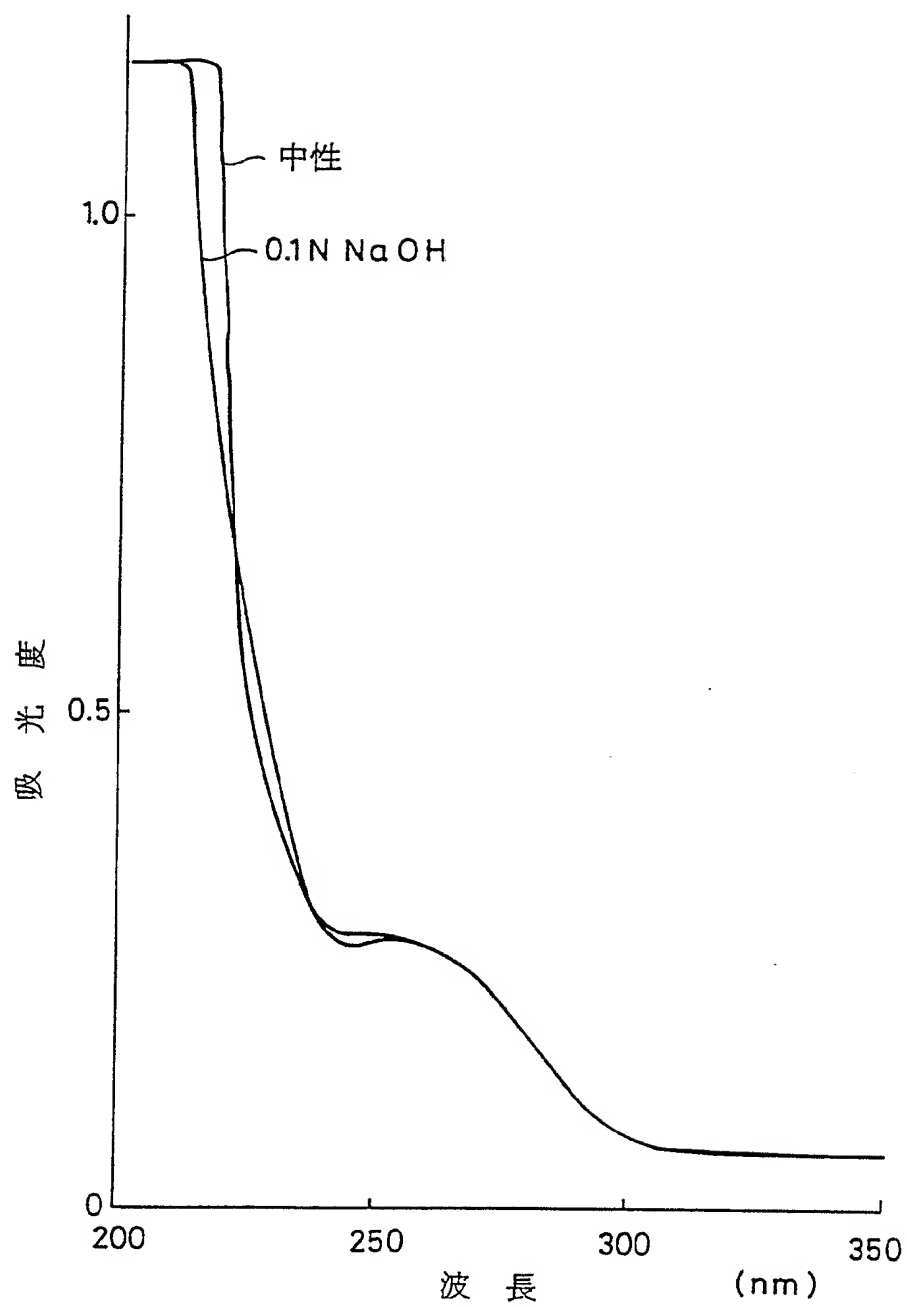
第 11 図



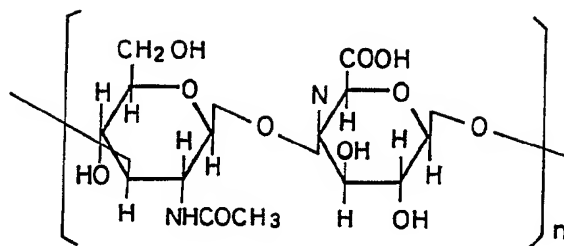
第12図



第13図

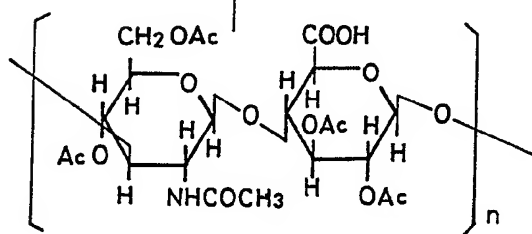


第14図



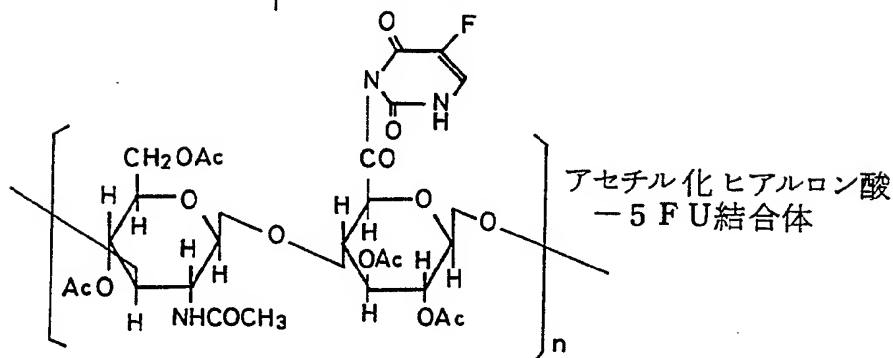
ヒアルロン酸

— 氷酢酸  
— 無水トリフルオロ酢酸

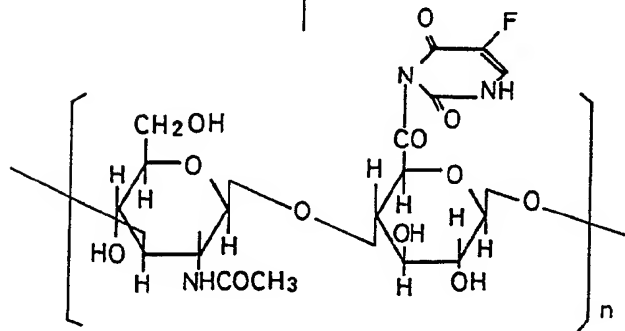


アセチル化ヒアルロン酸

— クロロデ酸イソブチル  
— トリエチルアミン  
— 5-FU



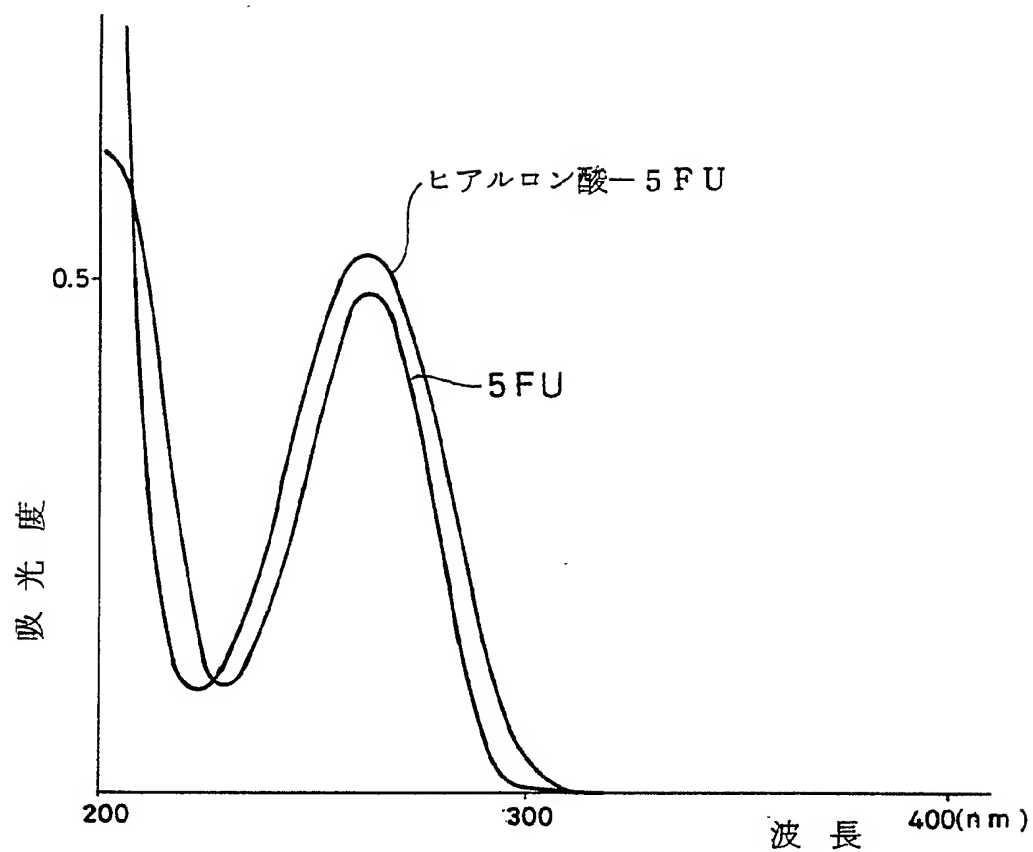
— NaOH



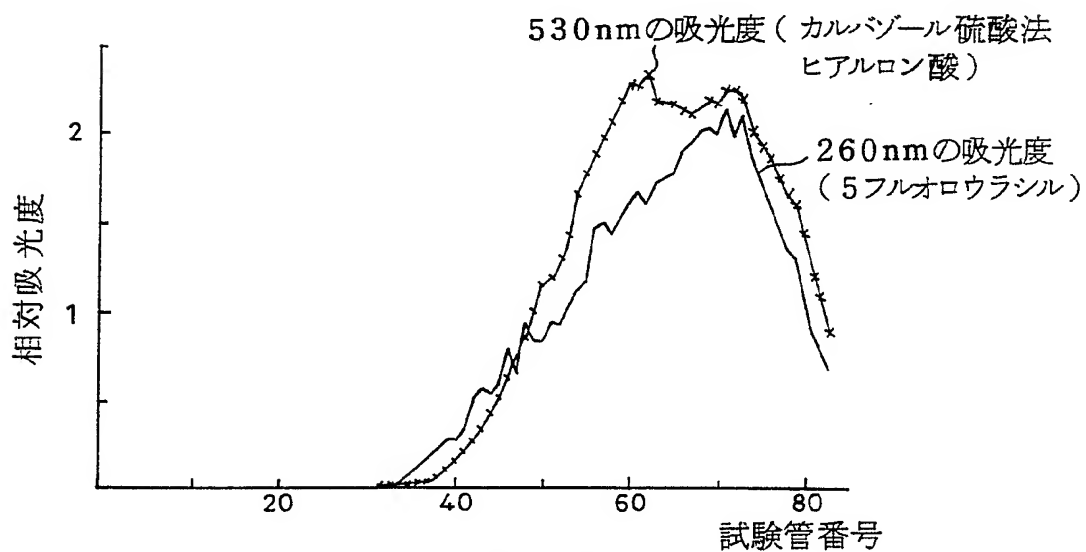
第15図

新たな用紙

13/17

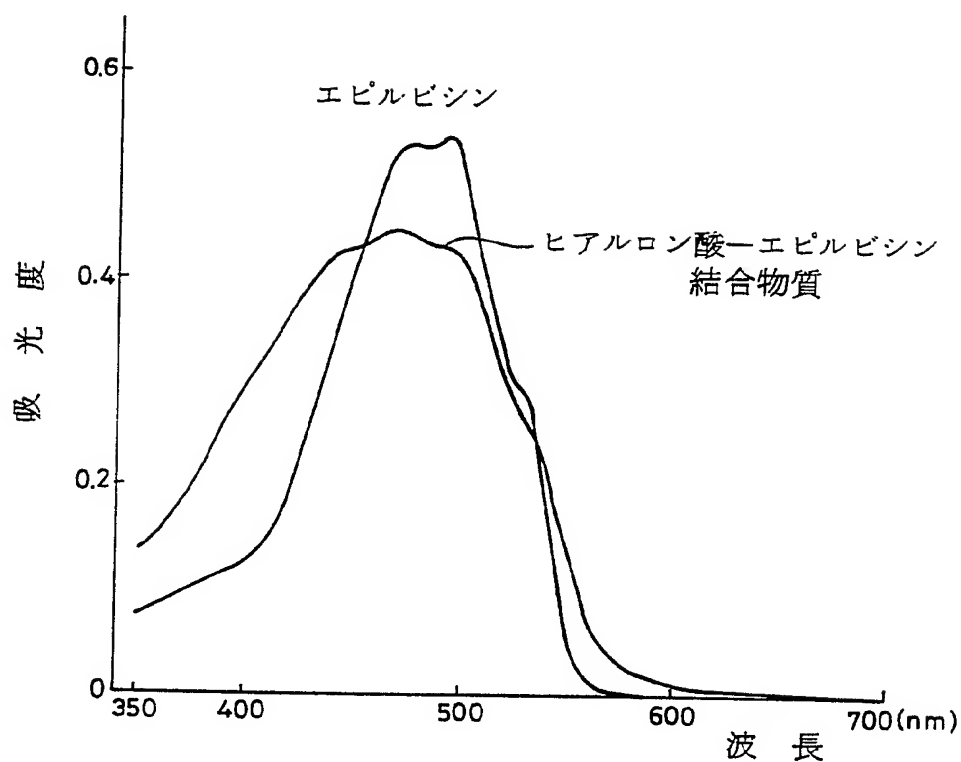


第16図

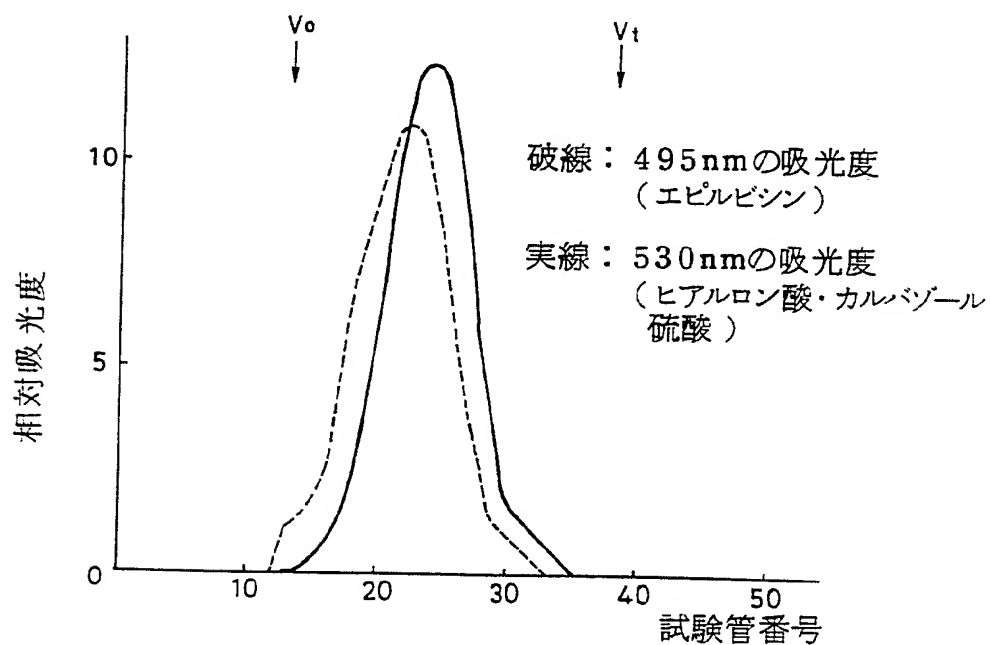


第17図

14/17

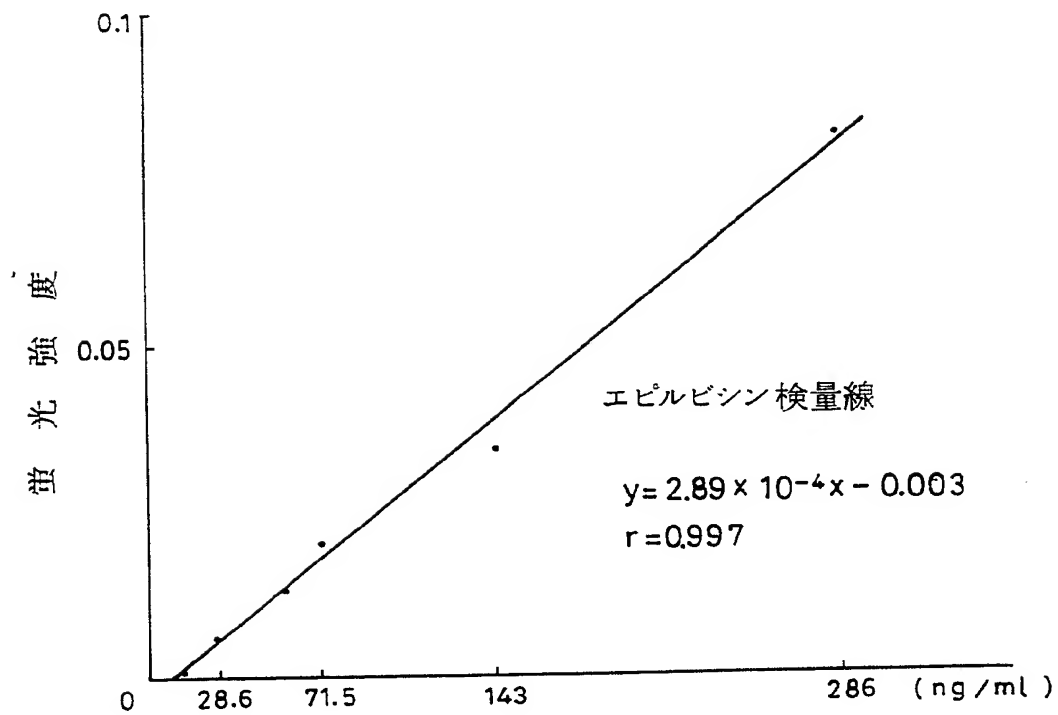


第18図

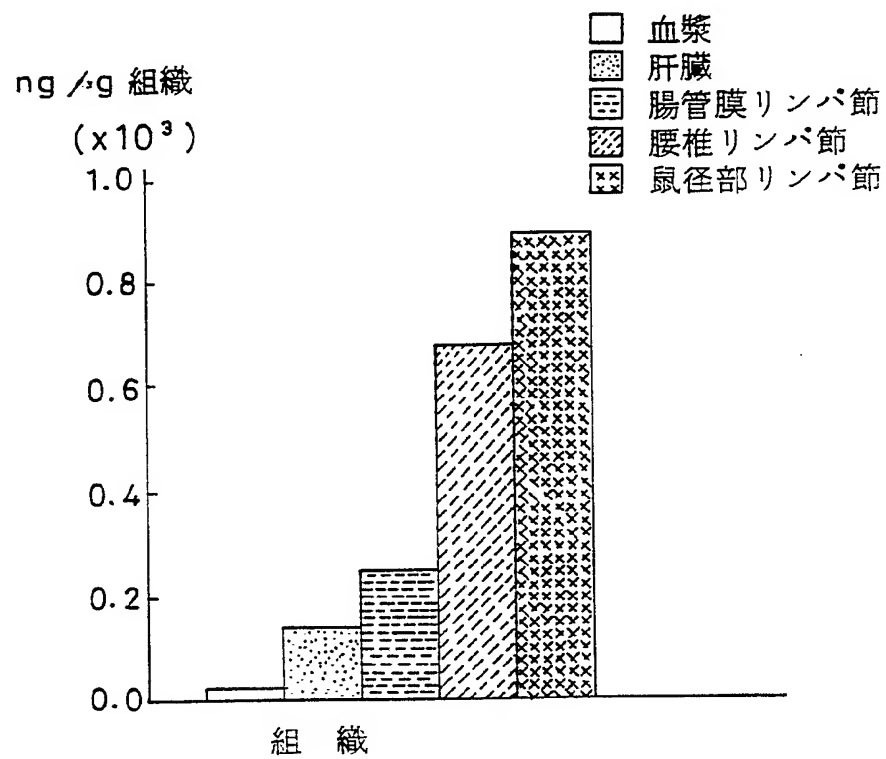


第19図

15/17

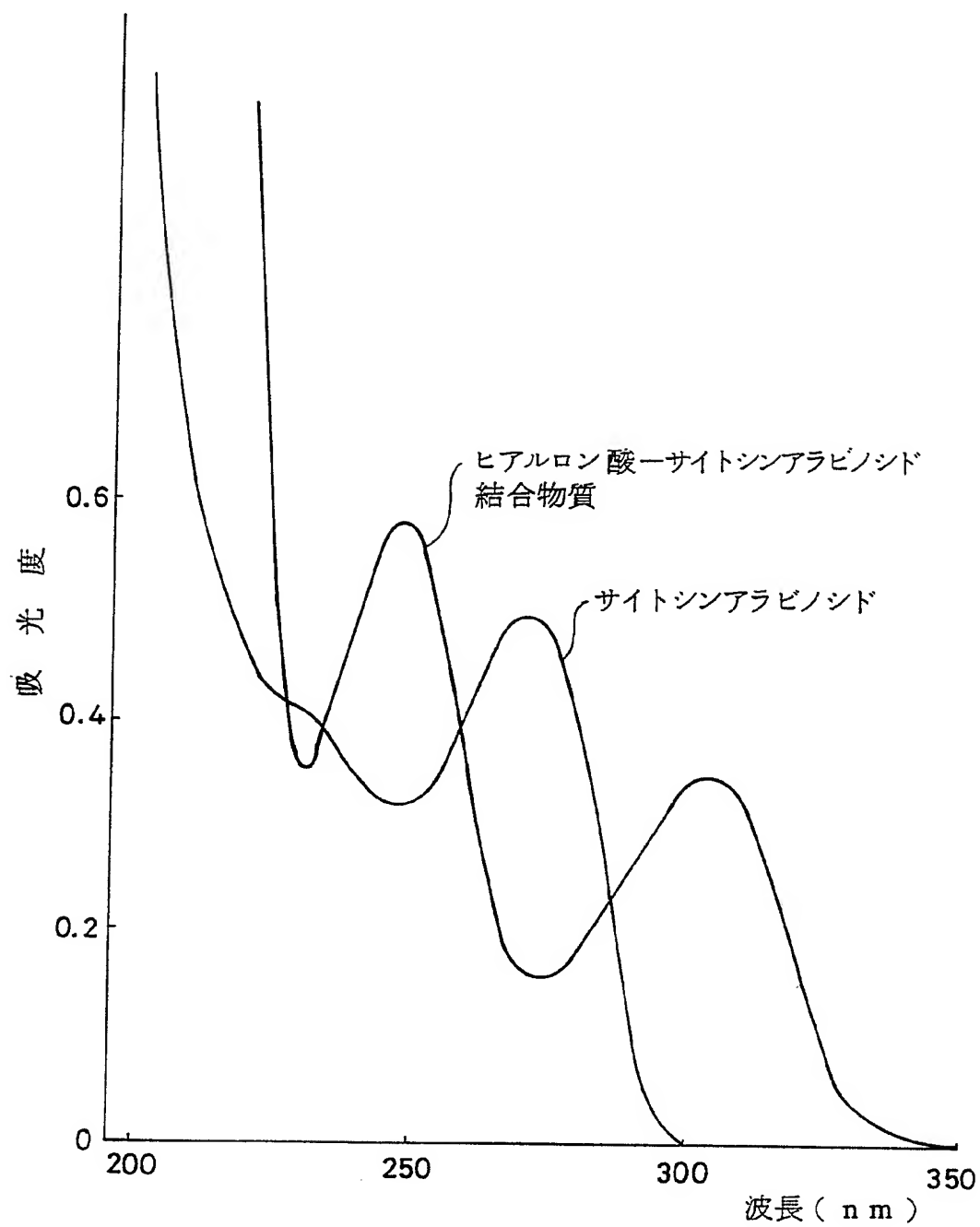


第20図



第21図

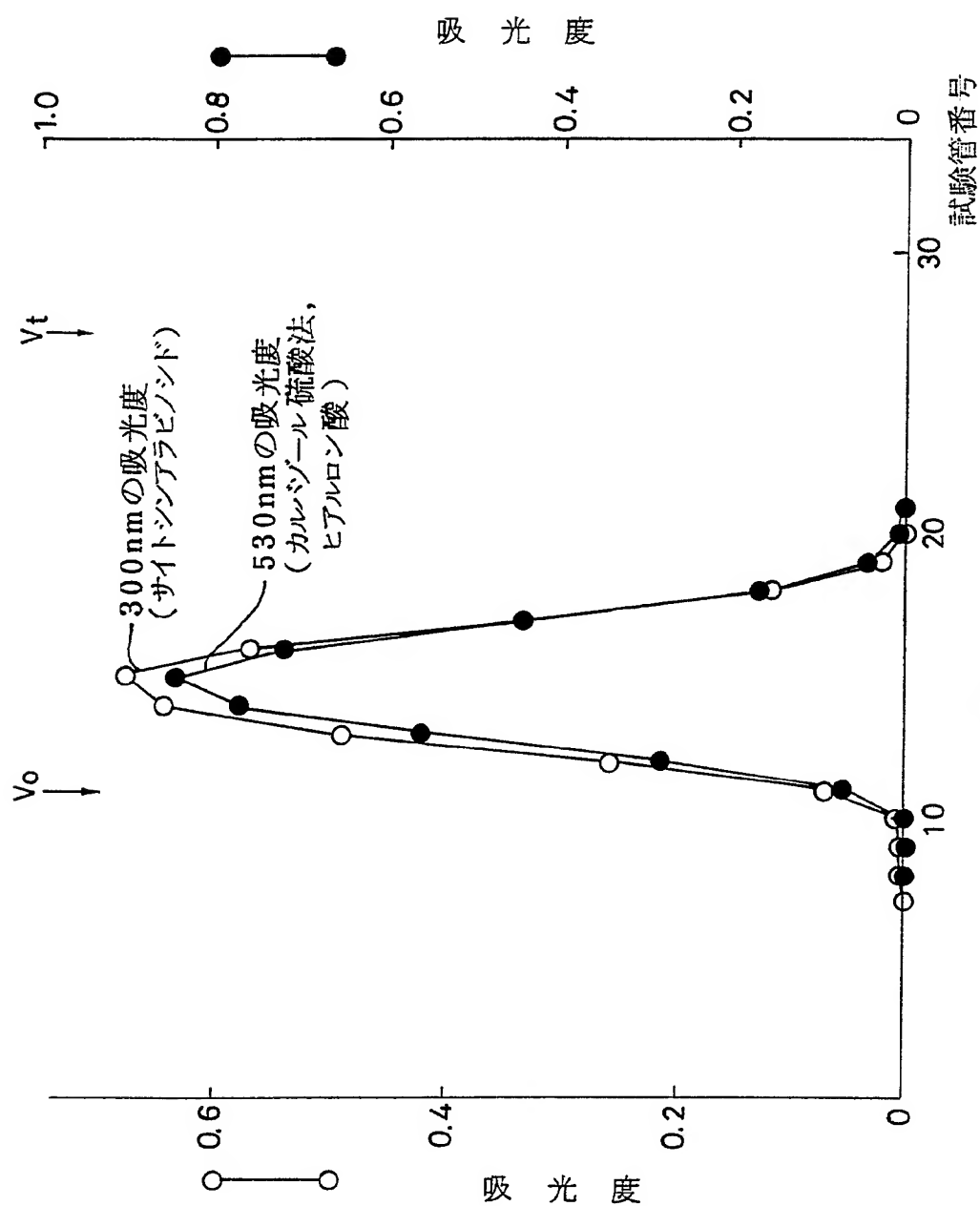
16/17



第22図



17/17



第23図

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP91/01431

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup> According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int. Cl <sup>5</sup> A61K47/48, A61K31/725		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	A61K47/36, 38, 48, A61K31/725	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup></b>		
Category <sup>10</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
X Y	JP, A, 2-231078 (Ube Industries, Ltd.), September 13, 1990 (13. 09. 90), (Family: none)	1, 2, 7-9, 3-6
Y	JP, A, 1-287041 (Roman Kogyo K.K.), November 17, 1989 (17. 11. 89), (Family: none)	1-9
X Y	JP, A, 1-54002 (Scandigen AB.), March 1, 1989 (01. 03. 89), & EP, A, 296740	1, 2, 7-9, 3-6
X Y	JP, A, 62-64802 (Fidia S.p.A.), March 23, 1987 (23. 03. 87), & EP, A, 216453 & US, A, 4851521	1, 2, 3-6
Y	JP, A, 62-255428 (Mobey Corp.), November 7, 1987 (07. 11. 87), & EP, A, 243867 & US, A, 4808576	1-9
Y	JP, A, 54-14513 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), February 2, 1979 (02. 02. 79),	1-9
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><sup>10</sup> Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
November 26, 1991 (26. 11. 91)		December 9, 1991 (09. 12. 91)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
Japanese Patent Office		

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

	(Family: none)	
A	JP, A, 61-229816 (Koken K.K.), October 14, 1986 (14. 10. 86), (Family: none)	1-9
Y	JP, A, 63-253030 (American Cyanamid Co.), October 20, 1988 (20. 10. 88), & EP, A, 281809 & US, A, 4857505	1-9
Y	JP, A, 63-264427 (The Green Cross Corp.), November 1, 1988 (01. 11. 88), (Family: none)	1-9

V. ☐ OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE <sup>1</sup>

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. ☐ Claim numbers ..... , because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claim numbers ..... , because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claim numbers ..... , because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

VI. ☐ OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING <sup>2</sup>

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.
2. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:
3. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:
4. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

## Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国 際 調 査 報 告

国際出願番号PCT/JP91/01431

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) <b>Int. Cl.<sup>5</sup></b> <b>A61K47/48, A61K31/725</b>		
II. 国際調査を行った分野		
調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料		
分 類 体 系	分 類 記 号	
<b>IPC</b>	<b>A61K47/36, 38, 48, A61K31/725</b>	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー ※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
X Y	JP, A, 2-231078 ( 宇部興産株式会社 ), 13. 9月. 1990 ( 13. 09. 90 ), (ファミリーなし)	1, 2, 7-9, 3-6
Y	JP, A, 1-287041 ( 株式会社 ローマン工業 ), 17. 11月. 1989 ( 17. 11. 89 ), (ファミリーなし)	1-9
X Y	JP, A, 1-54002 ( スカンディゲン エイ, ビー. ), 1. 3月. 1989 ( 01. 03. 89 ), & EP, A, 296740	1, 2, 7-9, 3-6
X Y	JP, A, 62-64802 ( フィディーア・ソシエタ・ペル・ アチオニ ), 23. 3月. 1987 ( 23. 03. 87 ), & EP, A, 216453 & US, A, 4851521	1, 2, <del>3-6</del> 3-6
Y	JP, A, 62-255428 ( モベイ・コーポレーション ),	1-9
<p>※ 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&amp;」 同一パテントファミリーの文献</p>		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
<b>26. 11. 91</b>	<b>09.12.91</b>	
国際調査機関	権限のある職員	
日本国特許庁 (ISA/JP)	特許庁審査官	<b>4 C 7 6 2 4</b>
	<b>種 村 慈 樹</b>	

## 第2ページから続く情報

( Ⅲ欄の続き )		
	7. 11月. 1987 ( 07. 11. 87 ) , & EP , A , 243867 & US , A , 4808576	
Y	JP , A , 54-14513 ( 協和醸酵工業株式会社 ) , 2. 2月. 1979 ( 02. 02. 79 ) , ( ファミリーなし )	1-9
A	JP , A , 61-229816 ( 株式会社 高 研 ) , 14. 10月. 1986 ( 14. 10. 86 ) , ( ファミリーなし )	1-9
Y	JP , A , 63-253030 ( アメリカン・サイアナミド・カンパ ニー ) ,	1-9

V. ☐ 一部の請求の範囲について国際調査を行わないときの意見

次の請求の範囲については特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律第8条第3項の規定によりこの国際調査報告を作成しない。その理由は、次のとおりである。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、国際調査をすることを要しない事項を内容とするものである。

2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有効な国際調査をすることができる程度にまで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。

3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲でありかつ PCT 規則 6.4(a) 第2文の規定に従って起草されていない。

VI. ☐ 発明の単一性の要件を満たしていないときの意見

次に述べるようにこの国際出願には二以上の発明が含まれている。

1. ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されたので、この国際調査報告は、国際出願のすべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に一部分しか納付されなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付があった発明に係る次の請求の範囲について作成した。  
請求の範囲 \_\_\_\_\_

3. ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲に最初に記載された発明に係る次の請求の範囲について作成した。  
請求の範囲 \_\_\_\_\_

4. ☐ 追加して納付すべき手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたため、追加して納付すべき手数料の納付を命じなかった。

追加手数料異議の申立てに関する注意

☐ 追加して納付すべき手数料の納付と同時に、追加手数料異議の申立てがされた。

☐ 追加して納付すべき手数料の納付に際し、追加手数料異議の申立てがされなかった。

III. 関連する技術に関する文献 (第2ページからの続き)

引用文献の カテゴリ※	引用文献名及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
Y	<p>20. 10月. 1988 (20. 10. 88) ,  &amp;EP , A , 281809 &amp; US , A , 4857505</p> <p>JP , A , 63-264427 ( 株式会社 ミドリ十字 ) ,  1. 11月. 1988 ( 01. 11. 88 ) , (ファミリーなし)</p>	1-9